

Der AF4- und AF4•MLL-Multiproteinkomplex und deren potentielle Rollen in transkriptionellen und epigenetischen Prozessen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Anne Benedikt
aus Marburg/Lahn

Frankfurt am Main, 2009
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14) der
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. D. Steinhilber
1. Gutachter:	Prof. Dr. R. Marschalek
2. Gutachter:	Prof. Dr. Th. Dingermann

Datum der Disputation: 08.07.2009

***Meinen Eltern und
meiner Schwester Lena***

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
1 Zusammenfassung	6
2 Einleitung	8
2.1 Krebs im Allgemeinen	8
2.2 Grundlagen der Leukämieentstehung	8
2.3 Chromosomale Translokationen	10
2.3.1 Chromosomale Translokationen allgemein	10
2.3.2 Die Translokation t(4;11)	11
2.3.3 Klinische Eigenschaften von t(4;11) assoziierten Leukämien	12
2.3.4 Molekulare Grundlagen der t(4;11) Translokation	14
2.4 Struktur und Funktion des MLL-Proteins	16
2.4.1 Funktionelle Domänen des MLL-Proteins	16
2.4.2 Die Bildung des MLL-Proteinkomplexes	19
2.4.3 Funktionen des MLL-Proteinkomplexes	23
2.5 Struktur und Funktion des AF4-Proteins	25
2.5.1 Funktionelle Domänen des AF4-Proteins	25
2.5.2 Aufbau des AF4-Proteinkomplexes	27
2.5.3 Funktionen des AF4-Proteinkomplexes	29
2.5.3.1 Allgemeine Funktion des AF4-Proteinkomplexes	29
2.5.3.2 Einfluss des AF4-Proteinkomplexes auf die Transkription	30
2.6 Die Fusionsproteine MLL•AF4(der11) und AF4•MLL (der4)	32
2.6.1 Bedeutung der Fusionsproteine für die Leukämogenese	32
2.6.2 Das Fusionsprotein MLL•AF4 (der11)	34
2.6.3 Das Fusionsprotein AF4•MLL (der4)	36
2.7 Rolle des P-TEFb, NFkB1 und NPM1 in der Transkription und der Zellentwicklung	38
2.7.1 Der transkriptionelle Elongationsfaktor P-TEFb und dessen Regulation ..	38
2.7.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFkB1 und dessen Funktion	41
2.7.3 Regulation der Transkription und des Zellwachstums über NPM1	42
2.8 Zielsetzung der Arbeit	44

3	Ergebnisse	46
3.1	Nachweis und Isolierung des AF4-/AF4•MLL-Proteinkomplexes	46
3.1.1	Größenbestimmung der Proteinkomplexe mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie	46
3.1.2	Reinigung des AF4-/AF4•MLL-Proteinkomplexes mittels Strep-Tag bzw. Strep- und Flag-Tag	50
3.2	Zusammensetzung der gereinigten Multiproteinkomplexe	54
3.2.1	Nachweis der AF4-/AF4•MLL-Komplexpartner anhand von Western Blot-Analysen	54
3.2.2	Identifizierung der AF4-/AF4•MLL-Komplexpartner über Massenspektrometrie	57
3.2.3	Verifizierung neuer Komplexpartner durch Co-Immunopräzipitationen.....	61
3.3	Nachweis der Methyltransferaseaktivität des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteinkomplexes	64
4	Diskussion.....	67
4.1	Neue Komplexpartner des AF4-Proteinkomplexes und ihre potentielle Funktion.....	68
4.2	Die Rolle des AF4•MLL-Proteinkomplexes in transkriptionellen und epigenetischen Prozessen.....	72
4.2.1	Der AF4•MLL-Proteinkomplex im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinkomplexen von AF4 bzw. MLL.....	72
4.2.2	Diskussion der Rolle des AF4•MLL-Proteinkomplexes im pathomolekularen Mechanismus zur Entstehung der t(4;11) Leukämie ...	77
5	Material und Methoden	80
5.1	Material	80
5.1.1	Chemikalien, Geräte und ihr Bezugsquellen.....	80
5.1.2	Pufferlösungen und Medien	85
5.1.3	Verwendete Organismen	88
5.1.4	Synthetische Oligonukleotide.....	89
5.1.5	Vektoren und Plasmide	91
5.1.6	Verwendete Antikörper.....	93
5.2	Molekularbiologische Methoden	96
5.2.1	Standardmethoden.....	96
5.2.2	Sequenzanalysen.....	97
5.3	Zelltransfektion	97

5.4	Proteinbiochemische Methoden.....	98
5.4.1	SDS-PAGE.....	98
5.4.2	Färbemethoden.....	99
5.4.3	Western Blot.....	101
5.4.4	Proteinreinigung.....	102
5.4.4.1	Spezifische Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin.....	102
5.4.4.2	Tandem-Affinitätsreinigung mittels Strep- und Flag-Tag.....	104
5.4.5	Immunopräzipitationen.....	104
5.4.6	Antikörperreinigung.....	105
5.4.7	Größenausschlusschromatographie.....	106
5.5	Massenspektrometrie.....	107
5.5.1	Tryptischer Verdau der Proteine.....	107
5.5.2	nLC-MALDI-MS/MS und Datenbanksuche.....	107
5.6	In vitro Methyltransferase-Assay.....	108
6	Literaturverzeichnis.....	109
7	Anhang.....	125
7.1	Tabellen der nLC-MALDI-MS/MS-Messungen.....	125
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	136
7.3	Lebenslauf.....	138
7.4	Publikationen und Vorträge.....	139
7.5	Danksagung.....	140

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1 :** Verteilung der verschiedenen *MLL*-Fusionspartnergene in *de novo* Leukämien bei Kindern sowie Leukämien bei Erwachsenen.
- Abb. 2.2:** Modell zur Entstehung chromosomaler Translokationen und *MLL* assoziierter Leukämien
- Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des *MLL*-Proteins
- Abb. 2.4:** Darstellung der proteolytischen Spaltung des *MLL*-Proteins und der Ausbildung des *MLL*-Proteinkomplexes
- Abb. 2.5:** Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des *AF4*-Proteins
- Abb. 2.6:** Schematische Darstellung des *AF4*-Proteinkomplexes
- Abb. 2.7:** Modell der Stimulation der RNA Pol II abhängigen transkriptionellen Elongation und die Vermittlung von koordiniertem Chromatin-Remodeling mittels *AF4*
- Abb. 2.8:** Darstellung des Fusionsproteins *MLL•AF4* (der11)
- Abb. 2.9:** Darstellung des Fusionsproteins *AF4•MLL* (der4) sowie dessen Prozessierung und Stabilisierung
- Abb. 2.10:** Mechanismen der Regulation des P-TEFb und dessen Rolle in der Transkription.
- Abb. 3.1:** Größenausschlusschromatographie (GAC) des *AF4*- bzw. *AF4•MLL*-Multiproteinkomplexes
- Abb. 3.2:** Strep-Tag-Affinitätsreinigung des *AF4*- bzw. *AF4•MLL*-Proteinkomplexes.
- Abb. 3.3:** Identifizierung bekannter und neuer Komplexpartner des *AF4*- bzw. des *AF4•MLL*-Proteinkomplexes.
- Abb. 3.4:** Immunopräzipitationen zur Verifizierung der neuen Komplexpartner des *AF4*- bzw. des *AF4•MLL*-Proteinkomplexes.
- Abb. 3.5:** Co-Immunopräzipitationen zur Verifizierung der neuen Komplexpartner des *AF4*- bzw. des *AF4•MLL*-Proteinkomplexes.

Abb. 3.6: Detektion der Histon-Methylierung durch den AF4- bzw. AF4•MLL-Proteinkomplex.

Abb. 4.1: Modell des aktiven / inaktiven Status des AF4-Multiproteinkomplexes unter Einbezug der neuen Komplexpartner.

Abb. 4.2: Vergleich des MLL- mit dem AF4•MLL-Multiproteinkomplex

Abb. 4.3: Vergleich des AF4- mit dem AF4•MLL-Multiproteinkomplex

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: nLC-MS-MS-Untersuchungen des AF4-Proteinkomplexes

Tab. 2: nLC-MS-MS-Untersuchungen des AF4•MLL-Proteinkomplexes

1 Zusammenfassung

Ein weit verbreitetes Merkmal von Leukämien sind genetische Veränderungen, wobei die Entstehung der Leukämie häufig mit reziproken chromosomalen Translokationen assoziiert ist, welche zur Bildung chimärer Genprodukte führen. Eine Vielzahl dieser reziproken Translokationen basieren auf Translokationen des *MLL* Gens (*Mixed Lineage Leukemia*), die mit dem Krankheitstyp einer AML oder einer ALL verbunden sind. Die häufigste chromosomale Translokation ist die t(4;11) Translokation. Sie tritt vor allem bei Kleinkindern bzw. auch bei älteren Patienten mit einer Sekundärleukämie auf und resultiert in einer akuten lymphatischen Leukämie. Es handelt sich um eine Hochrisikoleukämie, welche aufgrund ihrer nahezu Therapie-resistenten Blasten mit einer besonders schlechten Prognose assoziiert ist.

Der Mechanismus der Leukämieentstehung durch die *MLL*-Translokationen und der dabei entstehenden Fusionsproteine konnte bis heute nicht ausreichend geklärt werden. Für einige *MLL*-Translokationen, die mit einer myeloischen Leukämie verknüpft sind, konnte zunächst das onkogene Potenzial der Fusionsproteine im Mausmodell belegt werden. Im Bezug auf die t(4;11) Translokation blieben Ansätze zur Etablierung eines Tiermodells jedoch lang erfolglos. Erst 2006 konnten mittels einer *knock-in*-Strategie bzw. einem „*inverter*“-System Mausmodelle für *MLL*•*AF4* entwickelt werden, in denen die Mäuse nach sehr langer Latenzzeit ein disseminierte B-Zell-Lymphom aufwiesen. Ein neueres konditionales *MLL*•*AF4* *knock-in*-Modell, in dem *MLL*•*AF4* unter der Kontrolle des endogenen Zellzyklus-abhängigen *MLL*-Promotors steht, resultierte hingegen in einer ALL oder AML.

Im Allgemeinen steht somit bislang das *MLL*•*AF4*-Fusionsprotein im Vordergrund der Erforschung des pathomolekularen Mechanismus der t(4;11) Translokation. Aufgrund der Tatsache, dass in der Regel jedoch neben dem *MLL*•*AF4*- ebenso ein *AF4*•*MLL*-Fusionstranskript nachgewiesen werden kann, befassten sich Studien unserer Arbeitsgruppe mit der Funktion des *AF4*•*MLL*-Fusionsproteins. Diese Untersuchungen zeigten, dass das *AF4*•*MLL*-Fusionsprotein in der Zelle akkumuliert und in der Entwicklung onkogener Effekte sowie der Wachstumstransformation der Zelle resultiert. Ergänzend

belegten retrovirale Transduktions-/Transplantations-Experimente die Entwicklung einer akuten Leukämie im Mausmodell, wenn zuvor mit AF4•MLL bzw. mit AF4•MLL und MLL•AF4 transduzierte Stammzellen transplantiert wurden.

Um nun die Funktion des AF4•MLL-Proteins sowie die molekularen Ursachen der beobachteten Eigenschaften besser verstehen zu können, wurde der AF4•MLL-Proteinkomplex mittels einer Strep-Tag-Affinitätschromatographie erfolgreich gereinigt und ein Molekulargewicht von ca. 2 MDa über Größenausschlusschromatographie bestimmt. Damit nicht nur ein Vergleich mit dem MLL- sondern auch mit dem AF4-Wildtyp- Proteinkomplex möglich war, wurden ebenfalls eine Größenbestimmung und eine Reinigung des AF4-Proteinkomplexes durchgeführt. Die folgenden Analysen der Komplexkomposition über Immunopräzipitationen, Western Blot-Analysen sowie massenspektrometrische Analysen zeigten, dass sich der AF4•MLL-Proteinkomplex aus Mitgliedern der beiden Wildtyp-Proteinkomplexe zusammensetzt; es wurden P-TEFb, HEXIM1, NFκB1, NPM1, DDX6 und das AF4-Wildtypprotein aus dem AF4-Komplex sowie ASH2L, RBBP5, WDR5, CREBBP, HCF-1 und HCF-2 aus dem MLL-Komplex nachgewiesen. Auf diese Weise werden im AF4•MLL-Proteinkomplex Eigenschaften bzw. Funktionen beider Wildtyp-Proteinkomplexe kombiniert. Um einen weiteren Hinweis auf die Funktion zu erhalten, wurde ergänzend ein *in vitro* Histon-Methyltransferase-Assay etabliert, der für beide gereinigten Proteinkomplexe eine Histonmethyltransferase-Aktivität zeigte.

Basierend auf den vorliegenden Daten kann eine Konkurrenzsituation zwischen dem AF4•MLL-Proteinkomplex und den beiden Wildtyp-Proteinkomplexen um die entsprechenden Faktoren angenommen werden, welche die Assemblierung vollständiger und funktioneller Wildtyp-Proteinkomplexe verhindern könnte. Des Weiteren weisen die Ergebnisse auf Funktionen des AF4•MLL-Proteins in transkriptionellen Prozessen, Histonacetylierungen sowie der H3K4-Trimethylierung hin. Die Fehlregulation epigenetischer und transkriptioneller Prozesse durch die Anwesenheit des AF4•MLL-Proteinkomplexes spielt somit vermutlich eine entscheidende Rolle im pathomolekularen Mechanismus der t(4;11) Translokation.

2 Einleitung

2.1 Krebs im Allgemeinen

Der Begriff Tumor leitet sich vom lateinischen *tumor*, *-oris* ab und lässt sich mit „Geschwulst“ bzw. „Schwellung“ übersetzen. Als Synonyme können im Allgemeinen die Begriffe Gewächs und Neoplasie verwendet werden. In der Medizin wird demnach zwischen zwei Definitionen des Begriffs Tumor unterschieden:

- Im weiteren Sinn: jeglicher erhöhter Platzbedarf (Raumforderung) eines Gewebes (Intumeszenz), z.B. auch eine Schwellung bei einer Entzündung oder Zyste.
- Im engeren Sinn: Neubildungen von Körpergeweben (Neoplasien), die durch Fehlregulationen des Zellwachstums entstehen - hierbei wird keine Aussage über die Gut- oder Bösartigkeit der Neubildung getroffen.

Neoplasien können gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) sein sowie jegliche Art von Gewebe betreffen. Ihre Einteilung erfolgt nach ihrem biologischen Wachstumsverhalten und dem jeweiligen Ursprungsgewebe. Abhängig von ihrer Fähigkeit Metastasen auszubilden (Dignität) werden benigne, semi-maligne und maligne Tumore unterschieden. Je nach Lokalisation des Tumors und der Funktion des durch ihn geschädigten Gewebes, kann eine Fehlfunktion von Organen mit Beeinträchtigung des Gesamtorganismus bis zum Tod auftreten. Die Krankheit Krebs bezeichnet einen malignen Tumor (Pschyrembel, 2004).

2.2 Grundlagen der Leukämieentstehung

Die Leukämie, mitunter auch Blutkrebs genannt, ist eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems und des Knochenmarks, die erstmals 1845 von Rudolf Virchow beschrieben wurde. Der Begriff leitet sich von den griechischen Wörtern *leukos* für weiß und *haima* für Blut ab. In Deutschland erkranken nach Angaben des Robert-Koch-Instituts jährlich etwa 10.250 Menschen an Leukämie, bei Kindern handelt es sich mit 34,1% der Diagnosen um die

häufigste Krebserkrankung. Die häufigste Einzeldiagnose ist hier mit 27,5% die akute lymphatische Leukämie (ALL), wobei sie bei den unter 4-jährigen mehr als doppelt so häufig vorkommt wie bei anderen Altersgruppen.

Allgemein handelt es sich bei Leukämien um Erkrankungen, welche durch die Ansammlung maligner Leukozyten primär im Knochenmark und später im Blut gekennzeichnet sind. Diese abnormen Blutzellen besitzen keine normale Differenzierungsfähigkeit. Sie können sich im Knochenmark ungehemmt vermehren und so aufgrund der Verdrängung normaler hämatopoetischer Vorläuferzellen zu einer Knochenmarksinsuffizienz führen. Häufig entstehen die Leukämien durch die Mutation einer einzigen Zelle im Knochenmark oder im peripheren Gewebe, gefolgt von mitotischen Teilungen, welche in der Entstehung einer Population monoklonaler Zellen resultieren. In dieser Zellpopulation können anschließend weitere Mutationen auftreten, die letztendlich unkontrollierbares Tumorwachstum generieren.

Eine Klassifikation der Leukämien kann zunächst über den Ursprung der veränderten Blutzellpopulation erfolgen, so dass zwischen lymphatischen und myeloischen Leukämien unterschieden wird. Die Myeloblasten und Lymphoblasten werden mit Fortschreiten der Erkrankung aus dem Knochenmark ausgeschwemmt; die Folge ist eine erhöhte Zahl an leukämischen Zellen im peripheren Blut, die letztendlich die Infiltration anderer Organe mit sich bringt.

In Abhängigkeit vom klinischen Verlauf werden sowohl die myeloische als auch die lymphatische Leukämie zusätzlich in akute oder chronische Leukämien unterteilt. Die akuten Leukämien werden weiterhin aufgrund morphologischer Merkmale, mittels Vorgabe der French-American-British Working Group for Leukemia Classification (FAB), in Untergruppen eingeteilt. Für die akute myeloische Leukämie (AML) existieren die acht Untergruppen M₀ bis M₇ und für die akute lymphatische Leukämie (ALL) die drei Subtypen L₁-L₃ (Hoffbrand *et al.*, 2003).

2.3 Chromosomale Translokationen

2.3.1 Chromosomale Translokationen allgemein

Ein Kennzeichen der meisten Leukämien sind genetische Veränderungen. Die Entstehung der Krankheit, die Pathogenese, ist oftmals mit reziproken Translokationen assoziiert, welche zur Bildung chimärer Genprodukte führen (Look, 1997; Tenen *et al.*, 1997). Diese chromosomalen Translokationen sind mit Erkrankungen des hämatopoetischen Systems verbunden und scheinen somit ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt zu sein. Bei den betroffenen Genorten handelt es sich häufig um Transkriptionsfaktoren oder allgemein um Gene, die an wichtigen Entwicklungsprozessen der Zelle beteiligt sind und deren Produkte entscheidende Protein-Protein-Interaktionen eingehen (Rabbitts, 1999).

Die chromosomalen Translokationen werden nach der Beschaffenheit ihres molekularen Erscheinungsbildes in balancierte und unbalancierte Aberrationen eingeteilt. Bei balancierten Translokationen wurde ein Chromosom bzw. ein Chromosomenabschnitt auf ein anderes Chromosom übertragen, ohne dabei die Gesamtmenge des Erbgutes zu verändern. Es treten hier demnach keine Duplikationen oder Deletionen ganzer Chromosomen oder Chromosomenarme auf, sondern es handelt sich vorwiegend um reziproke Translokationen, welche durch einen Stückaustausch zwischen nicht-homologen Chromosomen gekennzeichnet sind, sowie um Inversionen (Pedersen-Bjergaard & Rowley, 1994).

Im Gegensatz zu den balancierten Translokationen basiert die unbalancierte Translokation auf einem Verlust (Deletion) oder einer Verdopplung (Duplikation) von genetischem Material. Diese Art der Translokation tritt häufig sekundär in soliden Tumoren während der Progressionsphase auf (Johansson *et al.*, 1996).

Bei den balancierten Translokationen wird zusätzlich in Typl- und TyplI-Translokationen unterschieden. In Typl-Translokationen klassifizierten Fehlregulationen treten Umlagerungen auf, die dazu führen, dass zelluläre Proto-Onkogene unter den Einfluss eines starken immunzellspezifischen Enhancers gebracht und dadurch aktiviert werden. Dies erfolgt beispielsweise durch die Translokation t(8;14) bei Burkitt-Lymphomen, welche eine

Umlagerung des Proto-Onkogens *c-Myc* in den *IgH*-Locus von B-Zellen und somit die Fusion eines intakten *c-Myc*-Gens mit dem Enhancer des *IgH*-Gens verursacht (Dalla-Favera *et al.*, 1982). Der starke Enhancer des *IgH*-Gens führt zu einer Überexpression von *c-Myc*, die schließlich in der Transformation der Zelle resultiert. Diese Form der Dysregulation entsteht durch fehlerhafte Funktion der immunzellspezifischen Rekombinationsenzyme, wodurch die Typl-Translokationen auf lymphatische Zellen des Immunsystems beschränkt bleiben (Sanchez-Garcia & Rabbits, 1993).

Die häufigeren TyplI-Translokationen sind durch die Bildung von chimären Fusionsgenen gekennzeichnet. Ein sehr bekanntes Beispiel ist die Translokation t(9;22), die zum sogenannten Philadelphia-Chromosom führt. Durch chromosomale Brüche im Intronbereich der Gene *BCR* und *ABL*, werden die N- bzw. C-terminalen Exons der Gene reziprok miteinander fusioniert. Es entstehen die beiden chimären Fusionsprodukte *BCR•ABL* und *ABL•BCR*, deren Expression zur krankhaften Entartung der Zelle führt (Rowley, 1973; Teyssier *et al.*, 1985). Fusionsprodukte wie die der TyplI-Translokationen treten sehr häufig als Ursache von Leukämien auf. Eine Vielzahl der beteiligten Gene ist in der Literatur beschrieben und kodiert für Faktoren, welche für die Entwicklung und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen entscheidend sind (Rabbits, 1999). Die Ursachen und Mechanismen zur Entstehung der Translokation sowie die Auswirkungen der Expression der Fusionsprodukte sind jedoch meist nicht bekannt.

2.3.2 Die Translokation t(4;11)

Reziproke chromosomale Translokationen der Bande q23 auf Chromosom 11 treten zahlreich auf und sind meistens mit dem Krankheitsphänotyp einer AML oder einer ALL verbunden (Ziemin-van der Poel *et al.*, 1991). Diese Translokationen führen zur Fusion des N-Terminus des *MLL*- (*Mixed Lineage Leukemia*) Gens mit zahlreichen Partnergenen; über 50 dieser Partnergene sind bisher bekannt (Meyer *et al.*, 2006). Die häufigste chromosomale Translokation ist mit 40% die t(4;11)(q21;q23) Translokation (Daser & Rabbits, 2005), welche zum ersten Mal 1979 bei einer akuten lymphatischen Leukämie

eines Kindes beschrieben wurde (Van den Berghe *et al.*, 1979). Das Partnergen des *MLL*-Gens ist im Falle der t(4;11)-Translokation das *AF4*-Gen, welches erstmalig 1992 nachgewiesen wurde (Gu *et al.*, 1992).

2.3.3 Klinische Eigenschaften von t(4;11) assoziierten Leukämien

Chromosomale Translokationen des *MLL*-Gens auf Chromosom 11 Bande q23 sind mit einer Reihe von hämatologischen Krankheitsbildern verknüpft; dazu gehören akute myeloische Leukämie (AML), T- und B-Zell-ALL, Therapiebedingte Myelodysplasien (t-MDS) und lymphoblastische Lymphome (Daser & Rabbitts 2005; Hess *et al.*, 2004; Thirman *et al.*, 1993). Die *MLL*-Translokationen sind besonders häufig bei Kindern mit AML bzw. ALL und wurden in bis zu 80% der akuten Leukämien bei Kindern gefunden (Nagayama *et al.*, 2006). Darüber hinaus sind die *MLL*-Translokationen auch in ca. 25% der Therapie-induzierten Leukämien bei Erwachsenen, deren primäre Krebserkrankung mit Topoisomerase II-Hemmstoffen behandelt wurde, zu finden (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 1998).

Die Prognose und Therapierbarkeit der Leukämien mit einer Translokation des *MLL*-Gens wird als sehr schlecht eingestuft, so dass sie als Hochrisikoleukämien klassifiziert werden. Da bisher über 50 verschiedene Translokationspartner bekannt sind und die Therapieprotokolle auf die jeweilige Translokation abgestimmt werden müssen, ist somit eine möglichst frühe Identifizierung des Translokationspartners nach der Diagnose entscheidend (Meyer *et al.*, 2006). Als sehr sensitive und zuverlässige Methode zur Identifizierung der Partnergene (inklusive neuer Partnergene) hat sich die Probenuntersuchung mittels LDI-PCR (*long distance inverse PCR*) herausgestellt (Meyer *et al.*, 2005). Zu den fünf häufigsten *MLL*-Translokationen gehören: t(4;11)(q21;q23) oder *MLL*–*AF4*; t(9;11)(p22;q23) oder *MLL*–*AF9*; t(11;19)(q23;p13.3) oder *MLL*–*ENL*; t(10;11)(p12;q23) oder *MLL*–*AF10*; und t(6;11)(q27;q23) oder *MLL*–*AF6* (Huret *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 2006 und 2009 in press).

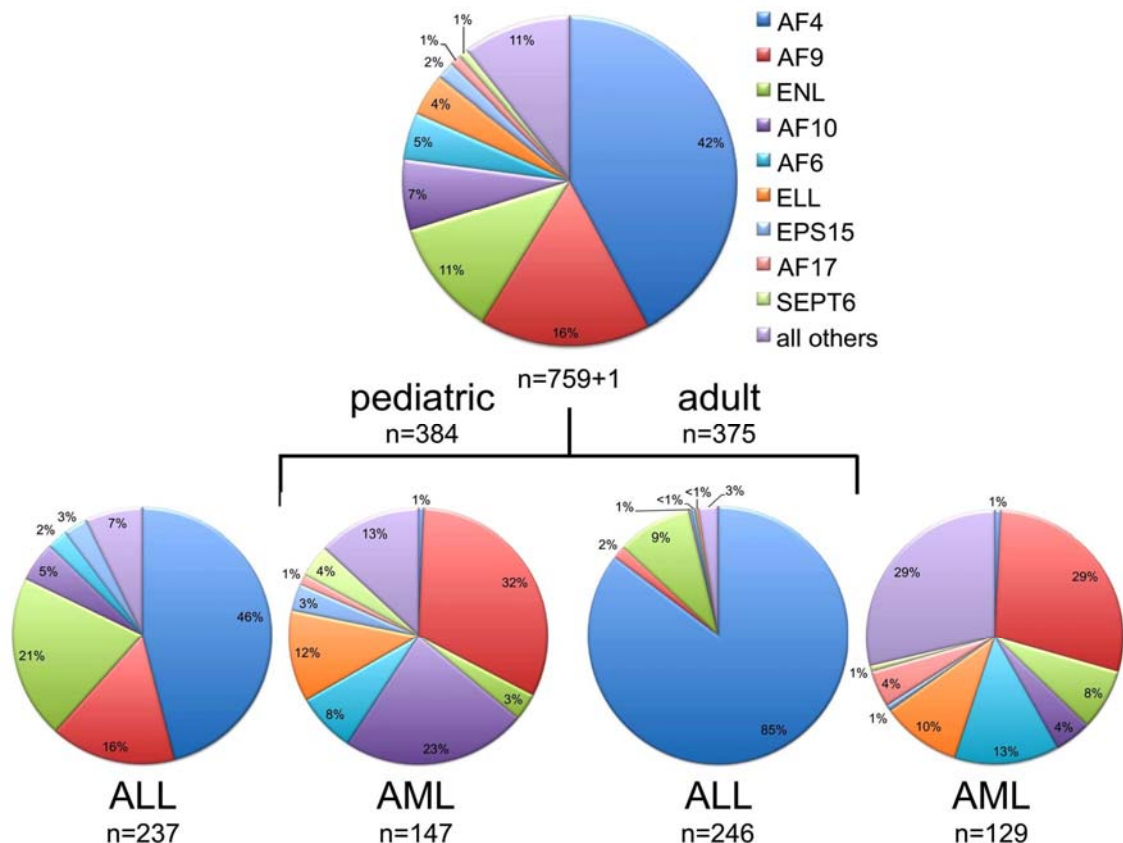


Abb. 2.1 :Verteilung der verschiedenen *MLL*-Fusionspartnergene in *de novo* Leukämien bei Kindern sowie Leukämien bei Erwachsenen.

Die Hauptfusionspartner sind AF4 (meist ALL), AF9 (meist AML) und ENL (ALL und AML). N: Anzahl der analysierten Patienten (Abbildung: Meyer C. und Marschalek R., DCAL 2009)

Die klinischen Charakteristika einer t(4;11) positiven ALL sind ein meist geringes Alter, Hyperleukozytose ($>50 \times 10^9/l$), Hepatosplenomegalie und starke ZNS-Infiltration der leukämischen Blasten (Chen *et al.*, 1993a; Felix *et al.*, 1999; Reaman *et al.*, 1999; Rubnitz *et al.*, 1996). Die leukämischen Zellen weisen die Expression von lymphatischen (CD13, CD19) und myeloischen (CD15, CD65) Oberflächenmarkern auf, werden jedoch morphologisch als ALL klassifiziert (Hess *et al.*, 1997; Pui *et al.*, 1991). Es ist demnach anzunehmen, dass die transformierten Zellen von sehr frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen, die noch in der Lage sind, in beide Linien des blutbildenden Systems zu differenzieren.

2.3.4 Molekulare Grundlagen der t(4;11) Translokation

Die t(4;11)-Translokation basiert auf einer reziproken Fusion von Chromosomenabschnitten des *MLL*-Gens auf Chromosom 11 und des *AF4*-Gens (*ALL-1 fused gene on chromosome 4*) auf Chromosom 4, welche in zwei Derivatchromosomen resultiert. An den Fusionsstellen entstehen dadurch die beiden Fusionsgene *Derivat 11/der11* (MLL•AF4), bestehend aus den N-terminalen Sequenzen des *MLL*- und den C-terminalen Sequenzen des *AF4*-Gens, sowie das reziproke *Derivat4/der4* (AF4•MLL) (Nilson *et al.*, 1996 und 1997).

Die Voraussetzung für die Entstehung von chromosomalen Translokationen sind DNA-Doppelstrangbrüche auf den beiden beteiligten Chromosomen. Diese Translokationsbrüche finden in einem abgegrenzten Bereich, der sogenannten Bruchpunktsclusterregion statt (Gu *et al.*, 1992; Reichel *et al.*, 1999). Diese Bruchpunkte befinden sich in Intronbereichen und nicht in Exonbereichen, so dass Fusionsgene mit intaktem Leserahmen entstehen können (Marschalek *et al.*, 1997). Die Ursache der DNA-Doppelstrangbrüche können zahlreiche unterschiedliche Prozesse sein; sie können durch Topoisomerase II, durch ionisierende Strahlung, durch cytotoxische Agenzien entstehen bzw. spontan auftreten. Besonders häufig treten sie in der frühen B- und T-Zellentwicklung auf, wenn die variablen Regionen der Immunglobuline und der T-Zellrezeptoren generiert werden. Die Variation dieser Regionen wird durch die RAG1/2-vermittelte Rekombination aus V-, (D-), und J-Gensegmenten gewährleistet (Fugmann *et al.*, 2000).

Nach Auftreten der Doppelstrangbrüche ist es für das Überleben der Zelle notwendig diese Chromatinschäden zu reparieren. Reparaturmechanismen, welche auf homologen Rekombinationsprozessen zwischen Schwesterchromosomen beruhen, spielen bei der Entstehung reziproker Translokationen wie der t(4;11)-Translokation keine Rolle, da diese zwischen nicht homologen Sequenzen stattfinden und bis heute keine übereinstimmenden homologen Sequenzen in Bereich der Bruchpunkte nachgewiesen werden konnten. Signaturen des *nonhomologous end joining* (NHEJ) hingegen konnten an allen Bruchpunktsstellen identifiziert werden (Gillert *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 1998). Diese Signaturen beinhalteten auch charakteristische Sequenzanomalien, wie

beispielsweise kleine Deletionen oder Duplikationen, die nur während eines NHEJ-Prozesses auftreten können. *MLL*-Translokationen entstehen demnach durch DNA-Doppelstrangbrüche und anschließende fehlerhafte Reparaturprozesse. Anschließend kann - abhängig von der Translokation - eine fehlerhafte Aktivierung von Onkogenen, Transkriptionsfaktoren oder an der Entwicklung beteiligter Gene auftreten. Dies kann weiterhin zu einer Veränderung im Genexpressionsprofil führen und resultiert dann letztendlich in der Leukämogenese (Klein, 2000).

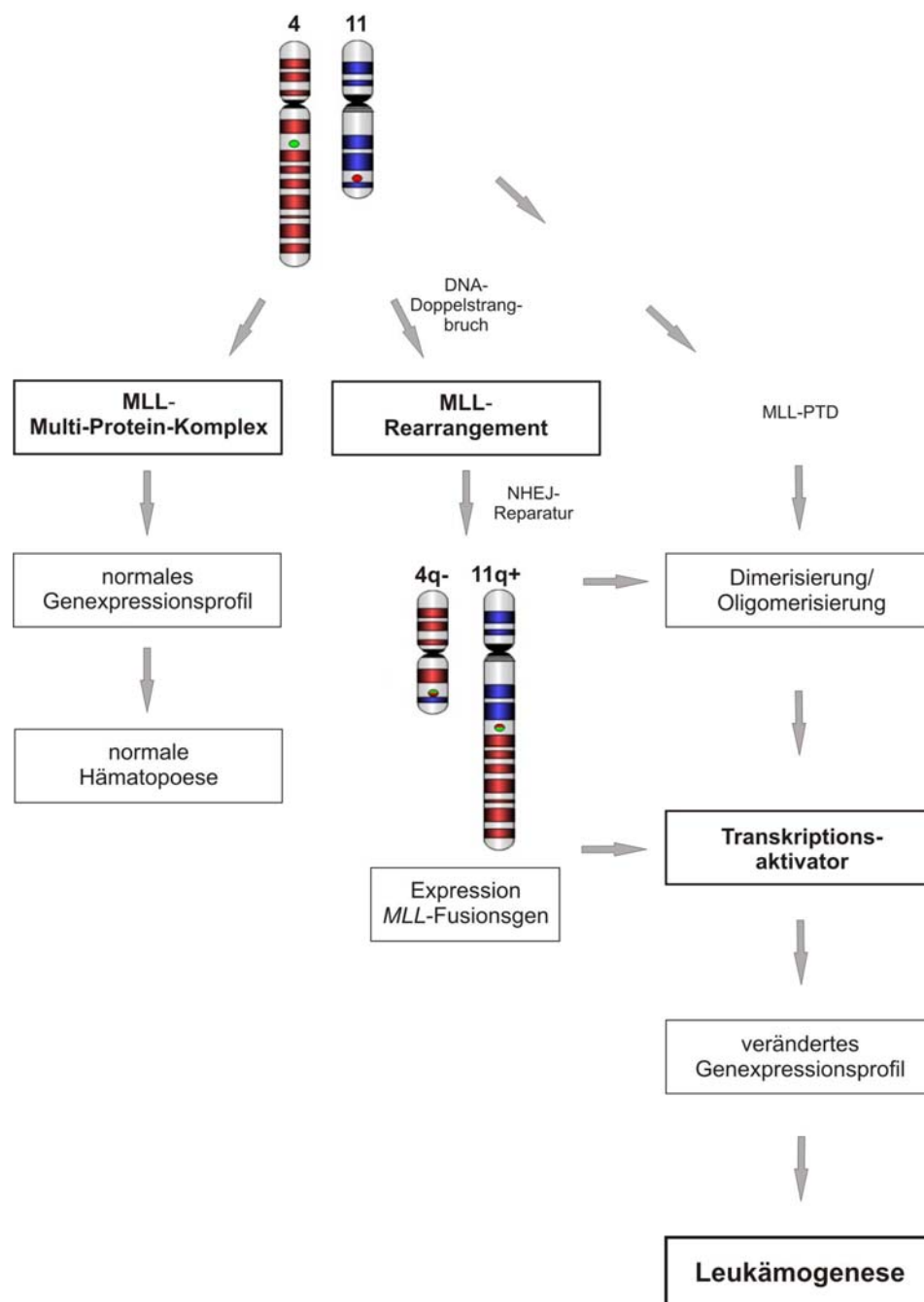


Abb. 2.2

Abb. 2.2: Modell zur Entstehung chromosomaler Translokationen und MLL assoziierter Leukämien

In der Abbildung ist anhand des Beispiels von MLL und AF4 die Entstehung einer reziproken Translokation unter Einfluss der NHEJ-Reparatur sowie die Entstehung einer *MLL*-PTD (*partial tandem duplication*) dargestellt. Weiterhin wird der Verlauf bis zur Leukämogenese verdeutlicht. Erfolgt keine Abweichung des *MLL*-Gens, so bildet sich der MLL-Multi-Protein-Komplex aus und sowohl die Genexpression als auch die Hämatopoese verlaufen normal.

Eine weitere Möglichkeit zur Entstehung von Abweichungen im *MLL*-Gen durch endogene Reparaturmechanismen basiert auf der Existenz von repetitiven Alu-Sequenzen in der Bruchpunktsregion des *MLL*-Gens. Nach einem DNA-Einzelstrangbruch ist es homologen Alu-Sequenzen möglich eine Schleife auszubilden, die von Reparaturproteinen als Einzelstrangdeletion erkannt wird. Das Auffüllen der Sequenz führt zu einer Duplikation (*PTD; partial tandem duplication*), die in einer folgenden S-Phase repliziert wird (Strout *et al.*, 1998).

2.4 Struktur und Funktion des MLL-Proteins

2.4.1 Funktionelle Domänen des MLL-Proteins

Das *MLL*-Gen und dessen Position auf Chromosom 11 Bande q23 konnten 1991 identifiziert werden (Ziemin-van der Poel *et al.*, 1991). Es weist hohe Homologie zu dem *Drosophila*-Gen *Trithorax* (*TRX*) auf (Tkachuk *et al.*, 1992) und wird, aufgrund der ersten Identifizierung seines Genlocus in einer akuten lymphatischen Leukämie, auch als ALL-1 (*Acute Lymphoblastic Leukemia 1*) bezeichnet (Cimino *et al.*, 1991; Gu *et al.*, 1992).

Das *MLL*-Gen besteht aus 92 kb und enthält 37 Exons, die für ein 3969 (bzw. 3972 oder 4005) Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 435 kDa kodieren (Marschalek *et al.*, 1997; Nilson *et al.*, 1996). Ausgeprägte Sequenzhomologien weisen das MLL-Protein, sowie das Mll-Protein der Maus und das Trx-Protein aus *Drosophila*, einer stark konservierten Proteinfamilie, der Trithoraxgruppe, zu. Proteine dieser Trithoraxgruppe besitzen die Fähigkeit, über Veränderungen in der Chromatinstruktur, einen aktiven Transkriptionsstatus für Gene zu vermitteln sowie diesen aufrecht zu erhalten (van Lohuizen, 1999). Im Gegensatz zur Trithoraxgruppe unterdrücken die Mitglieder der Polycomb-Gruppe (Pc-G-Proteine) die transkriptionelle Aktivierung. Proteine beider Gruppen dienen dazu, mittels epigenetischer

Veränderungen ein „zelluläres Gedächtnis“ der Transkription in verschiedenen Geweben zu etablieren.

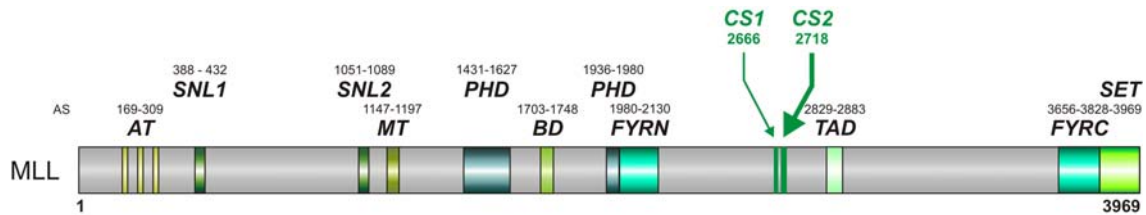


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des MLL-Proteins

AT: drei AT-Haken, DNA-Bindemotive; **SNL 1** und **2:** sub-Nukleäre Lokalisations-Signale 1 und 2; **MT:** homologes Motiv zur DNA-Methyltransferase; **PHD:** Plant Homeo Domain 1-3 und 4 (Zinkfinger-Motive); **BD:** Bromodomäne; **FYRN/C:** F/Y reiche Abschnitte am N- bzw. C-Terminus, Interaktionsdomänen; **CS1** und **CS2:** Cleavage site 1 und 2 für die Erkennung durch Taspase; **TAD:** Transaktivierungsdomäne; **SET:** (Suppressor of variegation, Enhancer of zeste und Trithorax) besitzt H3K4-Methyltransferaseaktivität. **AS:** Aminosäuren; Zahlen: Aminosäuren im MLL-Protein, an welchen sich die jeweilige Domäne befindet.

Eine schematische Darstellung der funktionellen Domänen des MLL-Proteins zeigt im C-Terminus des Proteins die SET-Domäne, welche im Vergleich des humanen und des *Drosophila*-Proteins die höchste Übereinstimmung aufweist. Die SET-Domäne ist in einer Gruppe von Proteinen zu finden, die an der Regulation transkriptioneller Prozesse beteiligt sind (Tschiersch *et al.*, 1994). Ihre Bezeichnung erhält sie durch eine Kombination aus *Suppressor of variegation su(var)3-9*, *Enhancer of zeste* und *Trithorax*, da sie speziell in diesen Genprodukten enthalten ist. Bei *Su(var)3-9* und *Enhancer of zeste* handelt es sich um Transkriptionsrepressoren, so dass die SET-Domäne mit der Assemblierung eines Repressorkomplexes verbunden wird (Laible *et al.*, 1997; Pirrotta, 1998; van Lohuizen *et al.*, 1998). MLL bzw. TRX hingegen aktivieren die Transkription. Die funktionelle Gemeinsamkeit der Proteine, welche eine SET-Domäne tragen, ist demnach auf die transkriptionelle Regulation beschränkt, denn sie können als Aktivatoren oder Repressoren wirken (Tschiersch *et al.*, 1994).

Die Transaktivierungsdomäne (TAD) ist ebenfalls im C-Terminus des MLL-Proteins lokalisiert und interagiert mit dem nukleären Coaktivator CREB-Binding-Protein (CREBBP). Diese Interaktion erleichtert anschließend die Bindung des phosphorylierten CREB (*cAMP-Response-Element-Binding*

protein), woraufhin die Aktivierung der Expression von Zielgenen erfolgen kann (Ernst *et al.*, 2001). Neben der SET-Domäne befinden sich mit den PHD-Fingern (*plant homeo domain*) zwei weitere homologe Bereiche im MLL und TRX. Dies sind Zink-Finger-Motive, die ein Protein-Protein-Interaktionspotential besitzen. Der 2. und 3. PHD-Finger können homodimerisieren und über die Bindung von Cyclophilin E (CYP33) Einfluss auf die Expression von Zielgenen nehmen. Hierzu wurde gezeigt, dass die Überexpression von CYP33 die Expressionsmuster der *HOX*-Gene verändert (Fair *et al.*, 2001). Weiterhin ließen neuere Daten vermuten, dass die PHD-Finger transkriptionelle Suppression vermitteln, welche beispielsweise über die Interaktion mit Co-Repressoren erfolgen könnte (Muntean *et al.*, 2008). Die Bromodomäne befindet sich zwischen dem 3. und dem 4. PHD-Finger. Bromodomänen binden an acetylierte Lysinreste von Histonen und sind im Allgemeinen in Chromatin-assoziierten-Proteinen zu finden, welche durch die Konformationsänderung des Chromatins die Transkription beeinflussen können (Dhalluin *et al.*, 1999).

Die drei AT-Haken im N-Terminus des MLL sind DNA-Bindedomänen und können in der kleinen Furche der DNA sequenzspezifisch binden (Zeleznik-Le *et al.*, 1994). Sie interagieren zudem mit der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) und dem pro-apoptotischen Protein GADD34. GADD34 bindet wiederum SNF5/INI1, ein Mitglied des SNF/SWI-Komplexes, welcher zur Umwandlung des Chromatins (*chromatin remodeling*) und dadurch zur Aktivierung der Transkription befähigt ist (Adler *et al.*, 1997 und 1999). Auf die AT-Haken folgen zwei Kern-Lokalisations-Sequenzen, SNL1 und 2, durch die eine spezifische Lokalisation des Proteins in bestimmten Kernbereichen möglich wird (Yano *et al.*, 1997).

Eine weitere essentielle Region des MLL-Proteins ist ein Cystein-reicher Abschnitt mit Homologie zur DNA-Methyl-Transferase sowie dem Methyl-CpG-binding-protein 1 (MBD1) und wird MT-Domäne genannt (Ma *et al.*, 1993). Wie die AT-Haken verfügt die MT-Domäne über die Fähigkeit DNA zu binden und ist zu einer spezifischen Bindung an unmethylierte CpG-Dinukleotid-Sequenzen in der Lage. Die Überexpression dieser Domäne hat transkriptions-reprimierende Wirkung (Birke *et al.*, 2002). Sie ist zudem in der Lage Histondeacetylasen

(HDAC), PcG-Proteine wie BMI-1 und HPC2 sowie den Corepressor CtBP zu rekrutieren, so dass MLL eine zusätzliche reprimierende Wirkung erhält (Xia *et al.*, 2003).

Neben den bisher genannten funktionellen Domänen befinden sich im MLL-Protein zwei konservierte Protease-Erkennungssequenzen, CS1 und CS2. An diesen Schnittstellen wird das MLL-Protein kurz nach der Translation durch die Taspase, eine Threonin-Aspartase, in die zwei Proteinfragmente MLL^N (p300) und MLL^C (p180) proteolytisch gespalten (Hsieh *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2002). Den entstandenen Proteinfragmenten konnten unterschiedliche Einflüsse auf die Transkription zugewiesen werden; während das MLL^N-Fragment reprimierend auf die Transkription wirkt, können dem MLL^C-Fragment aktivierende Eigenschaften zugeordnet werden (Yokoyama *et al.*, 2002).

Im Anschluss an die Prozessierung des MLL-Proteins sind die beiden Proteinfragmente in der Lage über die intramolekularen Interaktionsdomänen FYRN (MLL^N-Fragment) und FYRC (MLL^C-Fragment) zu interagieren (Hsieh *et al.*, 2003). Diese Dimerisierung führt zur Stabilisierung eines nicht-kovalenten MLL-Komplexes und zu dessen Lokalisation im Nukleus, wodurch die Plattform zur Ausbildung eines Multiproteinkomplexes generiert wird (Nakamura *et al.*, 2002).

2.4.2 Die Bildung des MLL-Proteinkomplexes

Die Ausbildung eines MLL-Proteinkomplexes wird durch die proteolytische Spaltung des MLL-Proteins und die anschließende Interaktion der beiden Proteinfragmente stabilisiert. Durch diese Stabilisierung wird die Assemblierung eines MLL-Multiproteinkomplexes ermöglicht, wobei die Anzahl der beteiligten Proteine an diesem Komplex kontrovers diskutiert wird. Nakamura *et al.* war es möglich ca. 29 Proteine zu identifizieren, welche Transkriptionskomplexen zugeordnet werden konnten, die als Aktivatoren und Repressoren wirken können. Beispiele sind hier der TFIID-Komplex, dessen Proteine an der spezifischen Erkennung von Promotoren und der Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie beteiligt sind, der SWI/SNF-Komplex, der aktivierenden und reprimierenden Einfluss haben kann, und die ausschließlich

reprimierenden Komplexe NuRD und Sin3A. Weitere Faktoren spielen eine entscheidende Rolle in der posttranslationalen RNA-Polyadenylierung (Nakamura *et al.*, 2002).

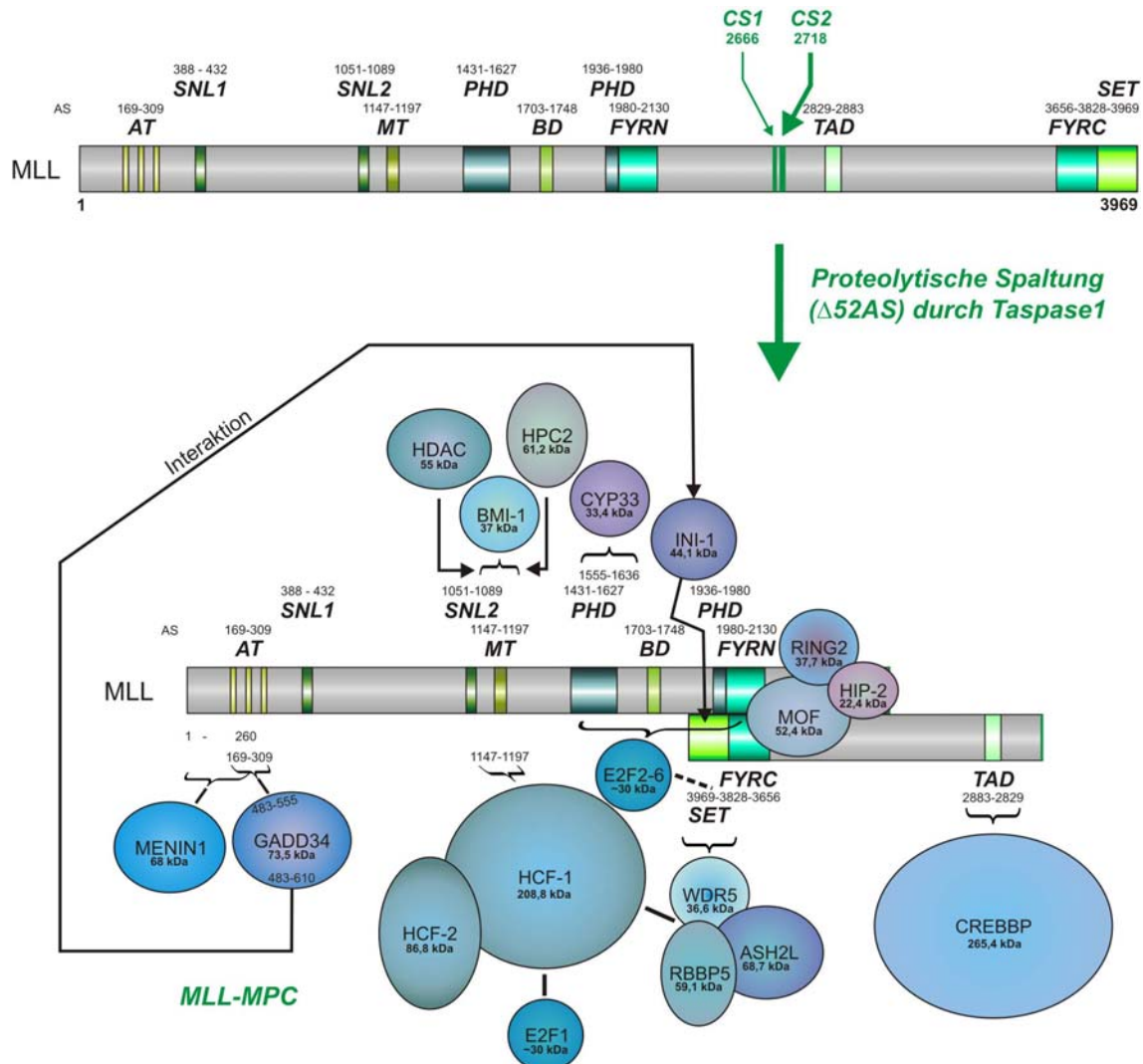


Abb. 2.4: Darstellung der proteolytischen Spaltung des MLL-Proteins und der Ausbildung des MLL-Proteinkomplexes

Schema der proteolytischen Spaltung des MLL-Proteins an den Schnittstellen CS1 und CS2. Die anschließende Interaktion der Peptidfragmente p300 (MLL^N) und p180 (MLL^C) über die intramolekularen Interaktionsdomänen FYRN und FYRC führt zur Stabilisierung des MLL-Komplexes und somit zur Bereitstellung einer Plattform zur Ausbildung eines Multiprotein-Komplexes (MPC). Die verwendeten Abkürzungen der MLL-Proteindomänen sind in Abbildung 2.3 erläutert. Zahlen: Aminosäuren im MLL-Protein, an welchen sich die jeweilige Domäne befindet bzw. die entsprechenden Aminosäuren die für eine Proteininteraktion identifiziert wurden.

Ein zweiter, mit 1 MDa Molekulargewicht, wesentlich kleinerer und nur aus sechs Komponenten bestehender MLL-Proteinkomplex konnte 2004 identifiziert werden (Yokoyama *et al.*, 2004). Übereinstimmende Proteine beider Komplexe waren RBBP5 und WDR5, die beide eine WD40-Protein-Protein-Interaktionsdomäne enthalten und an Methyltransferase-Komplexen beteiligt sind (Wysocka *et al.*, 2005). Die Bindung von RBBP5, WDR5 und ASH2L, ein weiteres Trithorax-Protein, erfolgt über die SET-Domäne des MLL-Proteins. Untersuchungen an dem Set1-Komplex in *Saccharomyces cerevisiae* zeigten, dass diese Proteine entscheidend für die Methyltransferase-Aktivität des MLL-Komplexes sind (Nagy *et al.*, 2002). Ergänzend konnte die Bindestelle des WDR5 an das MLL auf dieselbe Bindetasche festgelegt werden, über die WDR5 mit Histon H3 interagiert. Die Bindung von WDR5 an Histon H3 in Anwesenheit von MLL erfolgt bevorzugt an mono- oder di-methyliertem Histon H3, im Gegensatz zu unmethyliertem H3 (Song & Kingston, 2008). Neben der H3K4 Tri-Methylierung ist WDR5 zusätzlich an der Kontrolle der *HOX*-Genexpression beteiligt (Wysocka *et al.*, 2005). Weiterhin wird die H3K4 Tri-Methylierung, durch die Interaktion von ASH2L mit dem Transkriptionsfaktor AP2 δ , mit der Aktivierung spezifischer Targetgene wie beispielsweise dem *HOXC8*-Locus verknüpft (Tan *et al.*, 2008).

Eine andere Komponente des MLL-Komplexes ist die Histon 4 Lysin 16 Acetyltransferase MOF, wodurch dem Komplex neben der Methyltransferase- auch Acetyltransferase-Aktivität zugesprochen werden kann. Beide Funktionen werden für eine korrekte Transkription von Zielgenen benötigt (Dou *et al.*, 2005). Des Weiteren binden über die MT-Domäne des MLL-Proteins die Proteine HCF-1 und HCF-2 (*host cell factor*), welche eine Rolle in transkriptioneller Regulation spielen. Neuere Untersuchungen von Tyagi *et al.* zeigen, dass HCF-1 den MLL-Komplex zu E2F abhängigen Promotoren rekrutiert. Es handelt sich hierbei um Promotoren von Genen, welche für das Fortschreiten des Zellzyklus benötigt werden. Dies deutet darauf hin, dass HCF-1 über die E2F-Proteine zellzyklusspezifische transkriptionelle Aktivierung induziert, um somit Zellproliferation zu vermitteln (Tyagi *et al.*, 2007). Allgemein sind HCF-Proteine auch an SIN3-Komplexen beteiligt, jedoch konnte bisher keine Interaktion mit den SIN3-Faktoren nachgewiesen werden (Yokoyama *et al.*, 2004).

Ein weiteres Mitglied des MLL-Komplexes ist MENIN1. *MEN1* ist ein Tumorsuppressorgen, dessen Mutation zu dem Multiplen Endokrinen Neoplasie Syndrom Typ 1 führt (Guru *et al.*, 1997). Die Funktion von MENIN1 als Tumorsuppressor hängt wahrscheinlich maßgeblich mit der transkriptionellen Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p27 und p18 zusammen, da Menin1 den MLL-Komplex zu entsprechenden Promotoren rekrutiert (Milne *et al.*, 2002). MENIN1 spielt vermutlich eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der *HOX*-Genexpression, aufgrund der Tatsache, dass ein *knock-down* von MENIN1 die *HOXA9*-Expression um 80% verringerte. Ein ähnlicher Effekt konnte nur durch Ausschalten des *MLL* beobachtet werden, jedoch nicht bei Hemmung eines anderen Komplex-Mitglieds (Yokoyama *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde eine Interaktion von Menin1 mit dem Promotor von *Hoxc8* beobachtet (Hughes *et al.*, 2004).

Auch auf die onkogenen Eigenschaften einiger MLL-Translokationen wie MLL/ENL und MLL/AF10 scheint MENIN1 Einfluss zu haben. So zeigte Yokoyama *et al.*, dass myeloische Vorläuferzellen ohne MENIN1 Expression, trotz viraler Transduktion mit den Fusionsgenen, in Methylzellulose-Versuchen erheblich weniger Kolonien ausbildeten als die transduzierten Wildtyp-Zellen (Yokoyama *et al.*, 2005). Die Rolle der MLL-MENIN1-Interaktion in der Transformation bei MLL-Fusionsproteinen wurde nochmals deutlicher, indem die Hemmung dieser Interaktion zur Verringerung des *HOX*-Cofaktors MEIS1 und der Inhibierung der Zellproliferation führte (Caslini *et al.*, 2007). Des Weiteren existieren Daten, die für eine wichtige Funktion des MENIN1 in der normalen Hämatopoese sprechen. Zunächst wurde in Menin1 defizienten Mäusen eine verringerte *Hoxa9*-Expression, eine Beeinträchtigung der Entwicklung der hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie eine Verminderung der weißen Blutkörperchen im peripheren Blut festgestellt (Chen *et al.*, 2006). Hämatopoetische Studien nach dem Verlust von *MEN1* belegten unter anderem Auswirkungen wie die Verringerung B-lymphoider Vorläuferzellen und funktionelle Störungen der hämatopoetischen Stammzellen. Es lies sich demnach folgern, dass MENIN1 Einfluss auf die Regulation der hämatopoetischen Stammzellen und die lymphoiden Vorläuferzellen hat (Maillard *et al.*, 2008).

2.4.3 Funktionen des MLL-Proteinkomplexes

Das Trithorax-Protein (TRX) aus *Drosophila melanogaster* ist homolog zu MLL und hat entscheidenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung. Durch die Bindung an aktive Chromosomenabschnitte und die Sicherstellung der epigenetischen Vererbung dieser transkriptionell aktiven Chromosomenabschnitte an die Tochterzellen, ist es grundlegend an der präzisen Segmentierung des Körperbauplans beteiligt (Paro *et al.*, 1998; Tschiersch *et al.*, 1994). Die Funktion der Proteine der Trithoraxgruppe und deren Verknüpfung mit einem aktiven Transkriptionsstatus stehen im Gegensatz zu den Proteinen der Polycombgruppe, die eine stabile Repression während der Embryonalentwicklung sicherstellen. Über das Zusammenspiel der Proteine beider Proteinfamilien wird die Vererbung eines aktiven bzw. reprimierenden Zustands der Gene in Form von spezifischen Histon- und DNA-Methylierungsmustern ermöglicht. Es kann somit ein „transkriptionelles Gedächtnis“ etabliert werden.

Die ausgeprägte Homologie zwischen TRX und MLL spricht dafür, dass es sich auch bei MLL um ein für die Embryonalentwicklung entscheidendes Protein handelt. Ein Mausmodell bestätigte dies und zeigte, dass Embryonen mit einem homozygoten *Mill knock-out* (MLL^{-/-}) am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung starben. Die Expression der für die Segmentierung während der Embryonalentwicklung essentiellen *Hox*-Gene (Homeobox-Gene) konnte in diesen Embryonen nicht mehr nachgewiesen werden. Zudem wiesen heterozygote Embryonen homöotische Fehlbildungen des Skeletts auf (Yu *et al.*, 1995). Weitere Daten dieser Arbeitsgruppe belegen, dass die Aufgabe des MLL in der Aufrechterhaltung des Transkriptionsmusters der *Hox*-Gene liegt und nicht in der initialen Transkriptionsaktivierung (Yu *et al.*, 1998). Demnach konnte beispielsweise in den MLL^{-/-}-Embryonen bis Tag 9 die Expression von *Hoxa7* nachgewiesen werden, in späteren Tagen nicht mehr. Zusätzlich konnte in anderen Arbeiten eine direkte Bindung von MLL an die Promotoren von *Hoxa9* und *Hoxc8* festgestellt werden. Diese Promotoren werden über MLL an Histon H3 und H4 acetyliert sowie am Lysinrest 4 (K4) des Histons H3 methyliert, wobei die Methylierung über die Methyltransferase-Aktivität der SET-

Domäne erfolgt (Milne *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002). Ein *knock-out* der SET-Domäne resultiert in einer spezifischen Verringerung des monomethylierten H3K4 am *Hoxc8*- und am *Hoxd4*-Locus (Terranova *et al.*, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass MLL durch spezifische Protein-Protein-Interaktionen mit Ash2L oder auch Menin zu den Promotoren spezifischer Targetgene rekrutiert wird, zu denen auch der *Hoxc8*-Locus gehört (Hughes *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2008).

Die Methyltransferase-Aktivität der SET-Domäne des MLL-Proteins bestärkt die Theorie, dass MLL an epigenetischen Programmierungen beteiligt ist. Eine weitere Bestätigung dieser Rolle des MLL-Proteins ergibt sich aus der Tatsache, dass MLL und BMI-1, ein Polycomb-Protein in der Maus, antagonistische Auswirkungen auf die Segmentalentwicklung besitzen. So treten bei Untersuchungen von Mll- bzw. Bmi 1-defizienten embryonalen Fibroblasten reziproke Expressionsmuster der *Hox*-Gene auf (Hanson *et al.*, 1999).

Das MLL-Protein besitzt jedoch nicht nur Funktionen, die mit der Embryonalentwicklung assoziiert sind, sondern auch Aufgaben in der Hämatopoese. Die Expression des MLL-Proteins konnte in diesem Zusammenhang in den Organen des hämatopoetischen und des lymphoiden Systems nachgewiesen werden (Butler *et al.*, 1997). Des Weiteren ist die hämatopoetische Differenzierung erheblich von einer normalen *HOX*-Genexpression abhängig (Look *et al.*, 1997). Dies wurde durch Mll-defiziente Embryonen bestätigt, welche eine fehlerhafte fötale Hämatopoese aufwiesen (Hess *et al.*, 1997). Mäuse mit einer homozygoten Mutation des *Mll*-Gens waren embryonal letal und histologische Analysen ergaben eine Reduzierung der hämatopoetischen Vorläufer in der Leber homozygoter Embryos (Yagi *et al.*, 1998). Ergänzend konnte in einer Untersuchung der hämatopoetischen Differenzierung gezeigt werden, dass MLL für die Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen und Vorläuferzellen notwendig ist (Ernst *et al.*, 2004).

Neben der Wirkung auf die *HOX*-Genexpression besitzt der MLL-Komplex ebenso die Eigenschaft Einfluss auf die Regulation der Zellproliferation zu nehmen. Über einen tertiären Komplex aus MLL, HCF-1 und E2F erfolgt während des G1/S-Phase-Übergangs die Bindung an E2F-Promotoren, welche für das Fortschreiten des Zellzyklus notwendig sind (Tyagi *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde MLL als direkter Aktivator der Cycline und der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren identifiziert (Milne *et al.*, 2005; Takeda *et al.*, 2006). Weiterhin untersuchten Liu *et al.* die Proteinlevels des MLL-Proteins während des Zellzyklus, um weitere Erkenntnisse über dessen Rolle im Zellzyklus zu erlangen. Hierbei wurde eine strikte biphasische Expression des MLL nachgewiesen, welche den G1/S-Übergang sowie den M-Phase-Fortlauf sicherstellt. Eine Störung der MLL-Expression mittels shRNA bzw. die Überexpression des MLL resultierte in Defekten dieser Zellzyklusstadien. Diese Daten sprechen dafür, dass MLL während des Zellzyklus einen kritischen Wechsel aus Expression und Abbau durchlaufen muss, damit eine normale Regulation des Zellzyklus gewährleistet ist (Liu *et al.*, 2007).

2.5 Struktur und Funktion des AF4-Proteins

2.5.1 Funktionelle Domänen des AF4-Proteins

Das *AF4*-Gen (*ALL-1 fused gene on chromosome 4*) (Domer *et al.*, 1993), auch *FEL* genannt (Morrissey *et al.*, 1993), wurde erstmals 1992 als Translokationspartner des *MLL*-Gens in einer Leukämie beschrieben (Gu *et al.*, 1992). Es handelt sich mit 40% der Translokationen um den häufigsten Translokationspartner des *MLL*-Gens.

Das humane *AF4*-Gen wird in allen untersuchten Geweben sowie hämatopoetischen Zellen ubiquitär exprimiert (Chen *et al.*, 1993a; Frestedt *et al.*, 1996) und befindet sich auf Chromosom 4 Bande q21. Es besteht aus 300 kb, wobei das mRNA Transkript 10,5 kb umfasst und 23 Exons beinhaltet; vier der Exons sind alternative erste Exons (1a1-1a2, 1b oder 1c). Zusätzlich kann eine alternative Polyadenylierungsstelle im Intron 3 verwendet werden, die zu einem kürzeren 2,8 kb Transkript führt, welches als FelC bezeichnet wird.

Weiterhin konnte eine Bruchpunktsregion zwischen den Exons 3 und 6 identifiziert werden, in welcher bevorzugt DNA-Brüche stattfinden, die eine Voraussetzung für chromosomale Translokationen darstellen (Nilson *et al.*, 1997; Reichel *et al.*, 1999 und 2001).

Das AF4-Protein besitzt ein Molekulargewicht von 131 kDa (apparent bei 175 kDa) und konnte im Zellkern lokalisiert werden. Es gehört zur ALF-Proteinfamilie (AF4, LAF4 und FMR2) (Nilson *et al.*, 1997). Zusätzlich ist auch AF5q31 dieser Proteinfamilie zugeordnet worden. Sowohl *AF5q31* als auch *LAF4* wurden neben AF4 ebenso in *MLL*-Translokationen identifiziert (Taki *et al.*, 1999; von Bergh *et al.*, 2002). Für *FMR2* konnte hingegen keine Assoziation zu Leukämien nachgewiesen werden. Dieses Gen befindet sich auf dem X-Chromosom und seine Inaktivierung ist an den Phänotyp einer familiären mentalen Retardierung gekoppelt (Chakrabarti *et al.*, 1998; Gecz *et al.*, 1996).



Abb. 2.5: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des AF4-Proteins

NHD: N-terminale Homologiedomäne; **ALF:** konservierte Domäne der ALF-Proteinfamilie; **pSer:** Prolin-Serin-reiche Region; **NLS:** Kernlokalisationssequenz; **CHD:** C-terminale Homologiedomäne. AS: Aminosäuren; Zahlen: Aminosäuren im AF4-Protein, an welchen sich die jeweilige Domäne befindet.

Der Vergleich der AF4-Proteinsequenz mit LAF4, FMR2 und AF5 belegt, dass die Mitglieder der ALF-Proteinfamilie fünf konservierte Domänen (NHD, ALF, pSer, NLS und CHD) beinhalten. Bisher ist nur wenig über die Funktion dieser Domänen bekannt. Untersuchungen an AF4 und LAF4 zeigten jedoch, dass diese Eigenschaften wie die DNA-Bindung oder die Aktivierung der Transkription besitzen; eine Funktion als nukleärer Transkriptionsfaktor ist demnach anzunehmen. Die transaktivierende Funktion der beiden Proteine wird der pSer-Domäne zugesprochen (Ma & Staudt, 1996; Nilson *et al.*, 1997; Prasad *et al.*, 1995). Weiterhin konnte dem murinen AF4-Protein über ein *Af4 knock-out* Modell Einfluss auf die lymphoide Entwicklung zugesprochen werden (Isnard *et al.*, 2000).

Wie auch für MLL konnte in *Drosophila melanogaster* ein Homolog identifiziert werden, das *paired-rule* (Paar-Regel)-Gen *lilliputian* (*lilli*) (Tang *et al.*; 2001; Wittwer *et al.*, 2001). Es handelt sich um ein nukleäres Protein, welches im C-Terminus ebenfalls eine CHD, eine NLS und eine Prolin-Serin reiche Domäne besitzt. Im N-Terminus ist jedoch keine ALF-Domäne vorhanden, sondern Glutamin-reiche Domänen, ein AT-Haken (DNA-Bindemotiv) und eine Transaktivierungsdomäne (Wittwer *et al.*, 2001).

2.5.2 Aufbau des AF4-Proteinkomplexes

Im Jahr 2004 konnte erstmals gezeigt werden, dass AF4 und AF9 miteinander interagieren und einen Komplex bilden, welcher im Zellkern lokalisiert (Erfurth *et al.*, 2004). AF9 ist neben AF4 ebenfalls ein Translokationspartner des MLL-Gens. Ihre Fusionsprodukte MLL•AF4 und MLL•AF9 beinhalten weiterhin die Interaktionsdomänen für die Bindung zwischen AF4 und AF9, so dass auch bei einer MLL-Translokation eine Interaktion stattfinden kann und diese möglicherweise eine Rolle in der Leukämogenese spielt. Weitere Untersuchungen sprachen für diese Theorie, da ein Peptid, welches die Interaktion zwischen AF4 und AF9 inhibiert, in t(4;11)-Zelllinien Apoptose auslösen konnte (Srinivasan *et al.*, 2004). Aufgrund einer sehr hohen Homologie zwischen AF9 und ENL, die im Bereich der AF4-Interaktionsdomäne 91% beträgt (Rubnitz *et al.*, 1994), ist anzunehmen, dass auch ENL an AF4 binden kann. Darüber hinaus kann sowohl AF9 als auch ENL an das Polycomb-Protein Pc3 bzw. ENL an ABI-1 binden (Garcia-Cuellar *et al.*, 2000 und 2001; Hemenway *et al.*, 2001).

Zeisig *et al.* zeigte 2005, dass AF4 in einem zellulären Proteinkomplex vorliegt, der die transkriptionelle Elongation beeinflusst. In diesem Komplex interagiert AF4 nicht nur mit AF9, sondern auch mit ENL, AF10 und der H3K79-Methyltransferase DOT1L. Interaktionsstudien belegten sowohl die Bindung von ENL an AF4, AF5, AF9 und AF10 als auch die Existenz von ENL, AF4 und Pc3 in einem Komplex. Eine Größenbestimmung des Komplexes ließ jedoch darauf schließen, dass weitere Interaktionspartner im Komplex enthalten sein müssen (Zeisig *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte die Bindung von AF5 an den positiven Transkriptions-Elongations-Faktor b (P-TEFb) nachgewiesen werden. Es

handelt sich bei P-TEFb um einen Dimer aus CDK9 (Cyclin-abhängige Kinase 9) und CCNT1 (CyclinT1), welcher die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (RNA- Polymerase II CTD) phosphoryliert, um eine effiziente transkriptionelle Elongation zu ermöglichen (Estable *et al.*, 2002).

Neuere Studien belegen die Ko-Existenz von AF4, AF9 bzw. ENL, AF10, DOT1L und P-TEFb in einem Proteinkomplex. In dem hier beschriebenen Modell stimuliert Af4 die Kinase-Aktivität des P-TEFb und zusammen mit Af9/Enl und Af10 vermitteln sie die Dot1-abhängige H3K79-Methylierung sowie die RNA-abhängige transkriptionelle Elongation (Bitoun *et al.*, 2007). Die Rekrutierung des DOT1L ist ubiquitär mit aktiver Transkription in diversen Säugetierzelltypen assoziiert und korreliert mit der Anreicherung der H3K79 Di- und Tri-Methylierung in den Promotorbereichen der Gene (Steger *et al.*, 2008).

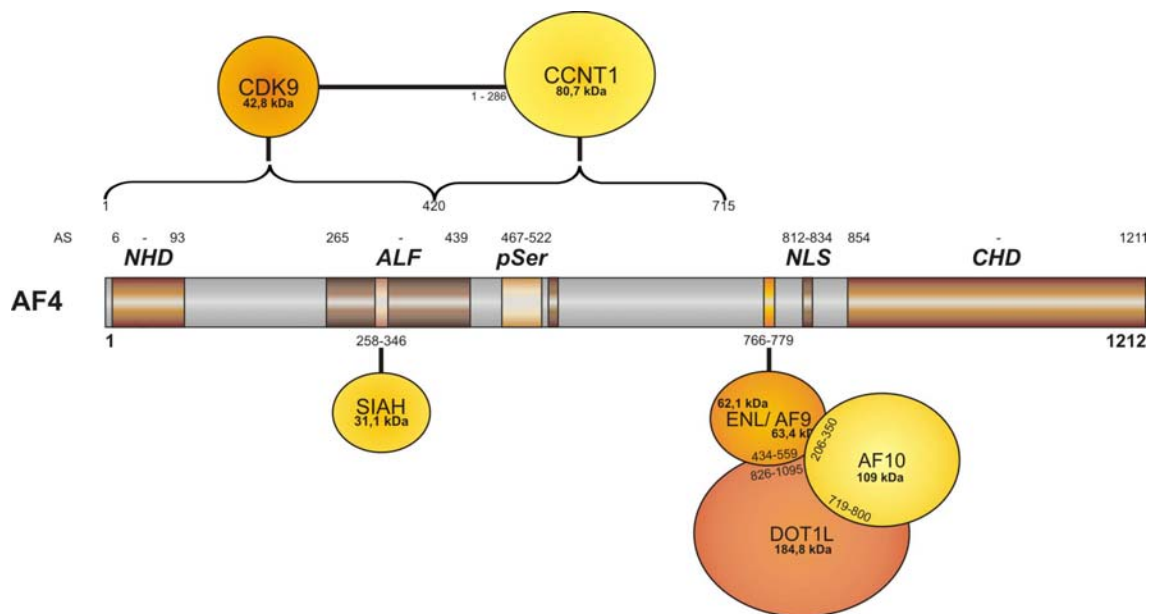


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des AF4-Proteinkomplexes

Die Abbildung zeigt ein Schema des AF4-Proteinkomplexes anhand der bisher für AF4 nachgewiesenen Interaktionen. Die verwendeten Abkürzungen der AF4-Proteindomänen sind in Abbildung 2.5 erläutert. Zahlen: Aminosäuren im AF4-Protein, an welchen sich die jeweilige Domäne befindet bzw. die entsprechenden Aminosäuren die für eine Proteininteraktion identifiziert wurden; geschweifte Klammer: Bereich der Proteininteraktion, wenn keine genauere Interaktionsdomäne identifiziert wurde.

In unserer Arbeitsgruppe konnte des Weiteren 2004 über Interaktionsstudien die Bindung der E3-Ubiquitin-Ligasen SIAH1 und SIAH2 an AF4 ermittelt werden. Diese Bindung an AF4 erfolgt spezifisch von SIAH1, wodurch AF4 über

Polyubiquitinylierung dem proteasomalen Abbau übermittelt wird. Als minimale Interaktionsdomäne konnte das Erkennungsmotiv PxAxVxP der SIAH-Ziel-Proteine identifiziert werden, welches sich in der ALF-Domäne befindet. Aufgrund der Tatsache, dass das AF4 Wildtyp-Protein in Zellen ohne Behandlung mit Proteasom-Inhibitor an der Nachweisgrenze liegt, ist eine strikte Regulation der Proteinmenge in der Zelle durch SIAH anzunehmen (Bursen *et al.*, 2004).

2.5.3 Funktionen des AF4-Proteinkomplexes

2.5.3.1 Allgemeine Funktion des AF4-Proteinkomplexes

Untersuchungen zur Funktion des AF4-Proteins zeigten zunächst, dass es neben LAF4 über DNA-bindende sowie transkriptionell aktivierende Eigenschaften verfügt und somit eine Rolle als Transkriptionsfaktor anzunehmen ist (Ma & Staudt, 1996; Prasad *et al.*, 1995). Weiterhin konnte in einem AF4 *knock-out* Modell der Einfluss des murinen Af4-Proteins auf die Hämatopoese belegt werden. Homozygot defiziente Mäuse wiesen Defekte in der B- und T-Zellentwicklung, eine Reduktion reifer B-Zellen im Knochenmark sowie eine Verringerung CD4/CD8-doppelpositiver Zellen im Thymus auf. Dies spricht für eine kritische Funktion des *AF4*-Gens in der normalen Entwicklung der Lymphozyten und führt zu der Annahme, dass ein Defekt des *AF4*-Gens oder dessen Translokation mit dem *MLL*-Gen den onkogenen Prozess in die lymphoide Richtung dirigiert (Isnard *et al.*, 2000).

Darüber hinaus handelt es sich bei AF4 um ein potentes Proto-Onkoprotein, dessen Expression über die Bindung an SIAH und dem damit verbundenen proteasomalen Abbau streng reguliert wird. In diesen Studien an MEF-Zellen (*murine embryonic fibroblasts*) wurden onkogene Eigenschaften für den AF4-N-Terminus, das AF4-Wildtyp-Protein und das AF4•MLL-Fusionsprotein nachgewiesen. Ihre Überexpression resultierte neben dem Verlust der Kontaktinhibition in der Wachstumstransformation der Zellen (Bursen *et al.*, 2004).

Des Weiteren besitzt das AF4-Protein Einfluss auf die normale Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS). Isaacs *et al.* identifizierte in diesem Zusammenhang die sogenannte „*robotic mouse*“, welche ihren Namen aufgrund ihrer eingeschränkten motorischen Fähigkeiten sowie den damit verbundenen mechanischen und ruckartigen Bewegungen erhielt. Als Ursache konnte der Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn der Mäuse festgestellt werden (Isaacs *et al.*, 2003). Die „*robotic mouse*“ Mutation ist eine *Missense*-Mutation im hoch konservierten SIAH-Erkennungsmotiv, so dass die Bindeaffinität zwischen Af4 und Siah entscheidend reduziert ist. Der proteasomale Abbau des Af4-Proteins im Gehirn der Mäuse ist somit nicht mehr ausreichend gewährleistet ist (Oliver *et al.*, 2004). Dies spricht für die Betrachtung der „*robotic mouse*“ als AF4-Überexpressions-Modell.

2.5.3.2 Einfluss des AF4-Proteinkomplexes auf die Transkription

In Studien zur genaueren Identifizierung der Funktion des AF4-Proteins, in Bezug auf die Regulation der Transkription, konnten Bitoun *et al.* eine Assoziation zwischen dem murinen Af4 und der RNA-Polymerase II abhängigen Elongation sowie dem Chromatin Remodeling belegen. Sie zeigten, dass Af4 die Kinaseaktivität des P-TEFb positiv reguliert und sie zusammen mit Af9/Enl und Af10 die Dot1-abhängige H3K79-Methylierung sowie die RNA Polymerase II abhängige transkriptionelle Elongation vermitteln (Bitoun *et al.*, 2007).

In diesem Modell liegt zu Beginn der Präinitiationskomplex vor (siehe Abb. 2.7 A), welcher unter anderem die RNA-Polymerase II und generelle Transkriptionsfaktoren beinhaltet. Zusätzlich wird der PAF-Komplex, welcher die lokale Unterbrechung der Nukleosomen vermittelt, rekrutiert; dieser Komplex rekrutiert wiederum den MLL-Komplex, wodurch eine H3K4-Methylierung im Promotorbereich erfolgt. Zunächst werden jedoch auch die negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF gebunden, so dass der Prozess arretiert.

Im nächsten Schritt (siehe Abb. 2.7 B) verhindert ENL bzw. AF9 den Abbau des AF4-Proteins, in dem es mit AF4 interagiert. Es folgt die Bindung von AF4-ENL/AF9 an P-TEFb, wodurch der inhibitorische 7SK/HEXIM1-Komplex verdrängt und die Kinaseaktivität des P-TEFb durch AF4 angeregt wird. P-TEFb

phosphoryliert nun DSIF und NELF, deren Bindung an den Komplex somit gelöst wird, sowie den Serinrest 2 der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II, welche dadurch für die Elongation in eine aktivere Form übergeht. Zusätzlich assoziiert ENL/AF9 mit Histon H3 und rekrutiert AF10 an den AF4-ENL/AF9-Komplex. Diese Interaktionen ermöglichen weiterhin die Rekrutierung von DOT1L an die elongierende Polymerase und vermitteln somit Chromatin Remodeling über DOT1L-abhängige H3K79-Methylierung.

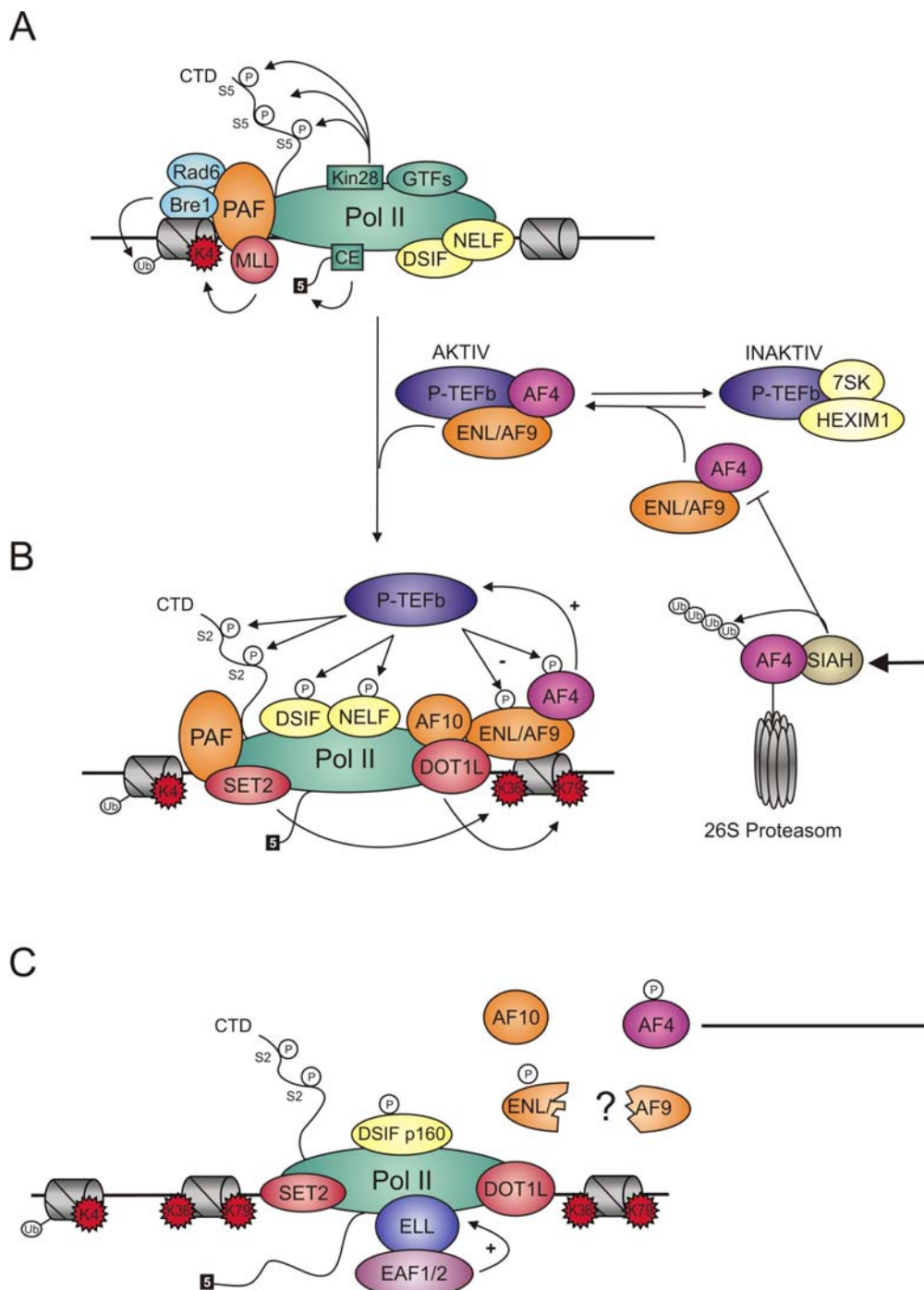


Abb. 2.7

Abb. 2.7: Modell der Stimulation der RNA Pol II abhängigen transkriptionellen Elongation und die Vermittlung von koordiniertem Chromatin-Remodeling mittels AF4

Die Abbildung zeigt ein Modell der Koordination der RNA-Polymerase II-Prozessivität sowie des Chromatin Remodeling in Form der DOT1L abhängigen H3K79-Methylierung während der transkriptionellen Elongation, vermittelt durch AF4, P-TEFb, ENL/AF9 und AF10 (geändert nach Bitoun *et al.*, 2007). A: Präinitiationskomplex; B: Übergang in die aktive elongierende Form sowie die Rekrutierung von DOT1L an die Polymerase; C: *Feedback*-Kontrolle.

Für den beschriebenen Prozess existiert darüber hinaus eine *Feedback*-Kontrolle (siehe Abb. 2.7 C), indem P-TEFb ebenso AF4 phosphoryliert und somit dessen Transaktivierungsaktivität herabsetzt. Weiterhin wird über die Phosphorylierung des ENL/AF9 deren Abbau vermittelt, so dass AF4 nicht mehr stabilisiert und über SIAH dem proteasomalen Abbau zugeführt wird.

2.6 Die Fusionsproteine MLL•AF4(der11) und AF4•MLL (der4)

2.6.1 Bedeutung der Fusionsproteine für die Leukämogenese

Die Leukämieentstehung durch die *MLL*-Translokationen konnte bis heute nicht ausreichend geklärt werden. Es entsteht jedoch immer ein Fusionsprodukt, welches den N-Terminus des MLL enthält, wobei für die Fusionspartner keine strukturellen Gemeinsamkeiten definiert werden konnten. Aufgrund dieser Gegebenheiten stellte Rowley 1992 die Hypothese auf, dass das MLL•AF4/der11 das für die Leukämogenese entscheidende Onkogen ist (Rowley 1992). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass in 80% der Patienten neben dem MLL•AF4 auch ein AF4•MLL Fusionstranskript vorhanden ist, während die restlichen 20% der Fälle auf komplexe Umlagerungen mit der Beteiligung eines dritten Partners zurückzuführen sind (Kowarz *et al.*, 2007). Es ist demnach anzunehmen, dass auch das AF4•MLL Fusionsprotein am Mechanismus der Leukämogenese beteiligt ist.

Im Allgemeinen resultieren die Fusionsgene in einem ektopischen Genexpressionsmuster, welches auf die Fähigkeit hindeutet an geänderte Zielgene zu binden. Die Expression der Fusionsproteine kann somit zur Störung der Entwicklung von Stamm- bzw. Vorläuferzellen führen, so dass unter anderem eine aberrante Proliferation und eine gehemmte Differenzierung auftreten (Cleary, 1991; Rabbitts, 1991). Für einige MLL-Translokationen konnte

bereits das onkogene Potential der Fusionsproteine im Tiermodell belegt werden, wobei es sich hier um myeloide Transformationen handelte (Corral *et al.*, 1996; DiMartino *et al.*, 2000; Lavau *et al.*, 1997 und 2000; Slany *et al.*, 1998).

Die Entstehung der Leukämie unter Einfluss der Fusionsproteine wird in zwei verschiedenen Modellen beschrieben. Das erste Modell bezieht sich auf Fusionspartner mit transaktivierender Domäne, die beispielsweise an Prozessen wie dem Zellzyklus, der Transkription oder der Signaltransduktion beteiligt sind. Diese Hypothese besagt, dass ein aktives MLL-Onkoprotein von den funktionellen Domänen beider Fusionspartner abhängig ist. Bestätigt wurde dies durch funktionelle Studien, die verdeutlichten, wie die Fusionsproteine MLL•AF9 (Hemenway *et al.*, 2001); MLL•ENL (Garcia-Cuellar *et al.*, 2000), MLL•ELL (Shinobu *et al.*, 1999; Simone *et al.*, 2001); MLL•AF10 (DiMartino *et al.*, 2002), MLL•AF6 (Akao & Isobe, 2000; Giugliano *et al.*, 2001) und MLL•CBP (Wang *et al.*, 2005) an der Transformation beteiligt sind. Das zweite Modell betrachtet Translokationen mit Genen zytoplasmatischer Proteine, die nicht unbedingt über eine transaktivierende Domäne verfügen. Diese Hypothese stützt sich auf die Annahme, dass eine Di- oder Oligomerisierung des MLL N-Terminus über Interaktionsdomänen des Fusionspartners ausreicht, um transaktivierende Eigenschaften zu vermitteln. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass *Mll-lacz* „knock-in“ Mäuse nach längerer Latenzzeit lymphatische sowie myeloische Leukämien ausbilden (Dobson, 2000). Weiterhin zeigte Martin 2003, dass die Dimerisierung eines verkürzten MLL Proteins für die Immortalisierung von Knochenmarkszellen ausreicht (Martin, 2003).

Bei Betrachtung der t(4;11) Translokation treffen jedoch beide Modelle nicht zu. Es handelt sich zwar bei AF4 um einen Transkriptionsfaktor als Partnerprotein, jedoch fehlen dem AF4-Protein die für eine Dimerisierung nötigen Domänen. Darüber hinaus konnte in *Soft Agar* sowie *Focus Formation Assays* für MLL•AF4 kein transformierendes Potential nachgewiesen werden (Bangerter, 2001; Bursen *et al.*, 2004). Ergänzend war eine Immortalisierung von Knochenmarkszellen durch MLL•AF4 nicht möglich (Lavau, 2004).

2.6.2 Das Fusionsprotein MLL•AF4 (der11)

Das MLL•AF4 bzw. der11 Protein ist eine Fusion aus dem N-Terminus von MLL, bestehend aus den AT-Haken, den Kernlokalisationsdomänen und der Methyltransferase-Domäne, sowie dem C-Terminus von AF4, der die Prolin-Serin-reiche Region, die Kernlokalisationssequenz und die C-terminale Homologiedomäne beinhaltet.

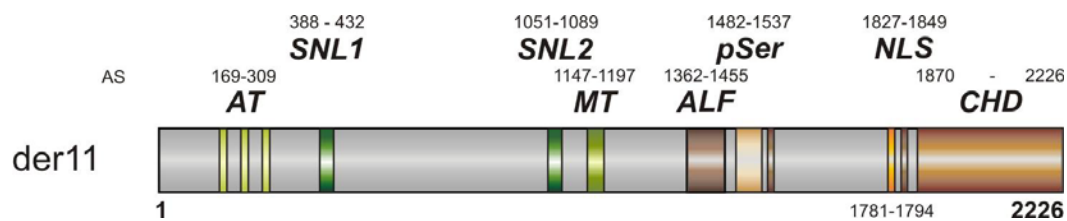


Abb. 2.8: Darstellung des Fusionsproteins MLL•AF4 (der11)

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der im MLL•AF4 Fusionsprotein vorhandenen Proteindomänen. Die verwendeten Abkürzungen der MLL- bzw. AF4-Proteindomänen sind in Abbildung 2.3 bzw. 2.5 erläutert. Zahlen: Aminosäuren im der11 Protein, an welchen sich die jeweilige Domäne befindet.

Untersuchungen der Funktion des MLL•AF4 Proteins zeigten zunächst, dass die Expression dieses Fusionsproteins keinen Einfluss auf die *HOX*-Genexpression hat (Bertrand *et al.*, 2003). Überexpressionsstudien wiesen jedoch auf eine Rolle im Zellzyklus und der Apoptose hin. Die verstärkte Expression des Fusionsproteins resultierte in verringertem Wachstum und in einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Die Zellen erwiesen sich zusätzlich als resistenter gegenüber Apoptose vermittelnden Stimuli (Caslini *et al.*, 2004; Gaussmann *et al.*, 2007). Die Unterdrückung der MLL•AF4 Expression in einer t(4;11) Zelllinie mittels siRNA führte hingegen zu einem starken Anstieg der Apoptose (Thomas *et al.*, 2005). Der Einfluss des MLL•AF4 auf den Zellzyklus lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass das Fusionsprotein wie das MLL-Wildtyp-Protein über die Interaktion mit MENIN in der Lage ist direkt die Expression der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren *p18* und *p27* zu regulieren. Ein Anstieg des *p27* in einer leukämischen Stammzellpopulation könnte beispielsweise zu einer verringerten Effizienz in der Antwort auf eine Standard-Chemotherapie führen (Milne *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2005).

Des Weiteren korrelieren MLL-Fusionsproteine wie das MLL•AF4 mit der positiven Regulation spezifischer mikroRNAs. Diese mikroRNAs haben Einfluss auf die Genexpression, indem sie den Abbau oder die translationale Inhibition der mRNAs ihrer Zielgene vermitteln (Bartel, 2004). Die erhöhte Expression dieser mikroRNAs in Leukämien kann wahrscheinlich auf die Rekrutierung von Drosha, welches für die Initiation der mikroRNA-Prozessierung verantwortlich ist, zurückgeführt werden. Die Rekrutierung des Drosha-Proteins wird durch dessen Interaktion mit dem Fusionsprotein gewährleistet (Nakamura *et al.*, 2007). In neuen Studien von Popovic *et al.* wurde die Rolle der mikroRNAs, in der durch die MLL-Fusionen vermittelten Immortalisierung, bestätigt. Die Untersuchungen zeigten, dass die Überexpression einer spezifischen mikroRNA (mir-196b) in Vorläuferzellen im Knochenmark zu einer Verstärkung der Proliferation und der Überlebensrate sowie zur Hemmung der Differenzierung führt (Popovic *et al.*, 2009).

Über eine *knock in*-Strategie bzw. ein „*inverter*“ Mausmodell unter Einsatz der Cre-Rekombinase konnten die beiden ersten Mausmodelle für MLL•AF4 etabliert werden. In beiden Fällen entwickelten die Mäuse nach langer Latenzphase ein disseminierte B-Zell-Lymphom jedoch keinen ALL-Phänotyp (Chen *et al.*, 2006a; Metzler *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu resultierte ein konditionales MLL•AF4 *knock in*-Modell, in dem MLL•AF4 unter der Kontrolle des endogenen Zellzyklus-abhängigen MLL-Promotors steht, in der Entwicklung einer ALL oder AML. Die ektopische H3K79 Methylierung stellte sich hier als charakteristische Eigenschaft einer murinen bzw. humanen MLL•AF4 ALL sowie als entscheidender Faktor für die Aufrechterhaltung der MLL•AF4 abhängigen Genexpression heraus (Krivtsov *et al.*, 2008). Ergänzend hierzu ließen Studien zur Identifizierung von MLL•AF4 Zielgenen darauf schließen, dass MLL•AF4 direkt ein zu hämatopoetischen Stammzellen ähnliches Transkriptionsmuster aktiviert, welches mit einem grundlegenden Defekt in der Chromatinstruktur verknüpft ist (Guenther *et al.*, 2008).

In retroviralen Transduktions-/Transplantations-Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurden murine hämatopoetische Stammzellen mit den Fusionsallelen MLL•AF4 oder AF4•MLL bzw. beiden zusammen transduziert und in Mäuse transplantiert. Entgegen den Beobachtungen von Krivtsov *et al.*

resultierte in diesem Modell die Expression von MLL•AF4 allein in keinem Krankheitsphänotyp. Rezipiente Mäuse, welche mit AF4•MLL oder doppelt-transduzierten Stammzellen transplantiert wurden, entwickelten jedoch eine proB ALL, eine B/T biphänotypische akute Leukämie oder eine „*mixed lineage leukemia*“ (MLL) (Bursen *et al.*, 2009 submitted). Diese Studien weisen daraufhin, dass beide Fusionsproteine zum Phänotyp der t(4;11) Leukämie beitragen.

2.6.3 Das Fusionsprotein AF4•MLL (der4)

Das Fusionsprotein AF4•MLL bzw. der4 besteht aus dem N-Terminus von AF4 und dem C-Terminus von MLL. Es beinhaltet somit die NHD- und die ALF-Domäne des AF4-Proteins sowie die Bromodomäne, die PHD-Motive, die Transaktivierungsdomäne, die SET-Domäne, die Interaktionsdomänen FYRN/FYRC und die beiden Taspaseschnittstellen CS1/2 des MLL-Proteins. Wie das Wildtyp-MLL kann ebenso das AF4•MLL durch die Taspase proteolytisch gespalten werden. Es entstehen die beiden Peptidfragmente der4•N (p178) und MLL•C (p134), welche analog zum MLL miteinander interagieren können und somit die Ausbildung eines Proteinkomplexes ermöglichen.

Die Interaktion zwischen den beiden Fragmenten vermittelt eine Stabilisierung des AF4•MLL Proteins, da es zwar noch von SIAH gebunden wird, jedoch im Gegensatz zum Wildtyp-AF4 und zum ungeschnittenen AF4•MLL nicht mehr dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Dies resultiert in der Akkumulation des AF4•MLL Proteins und in Folge dessen zur Entwicklung onkogener Effekte sowie der Wachstumstransformation der Zelle (Bursen *et al.*, 2004).

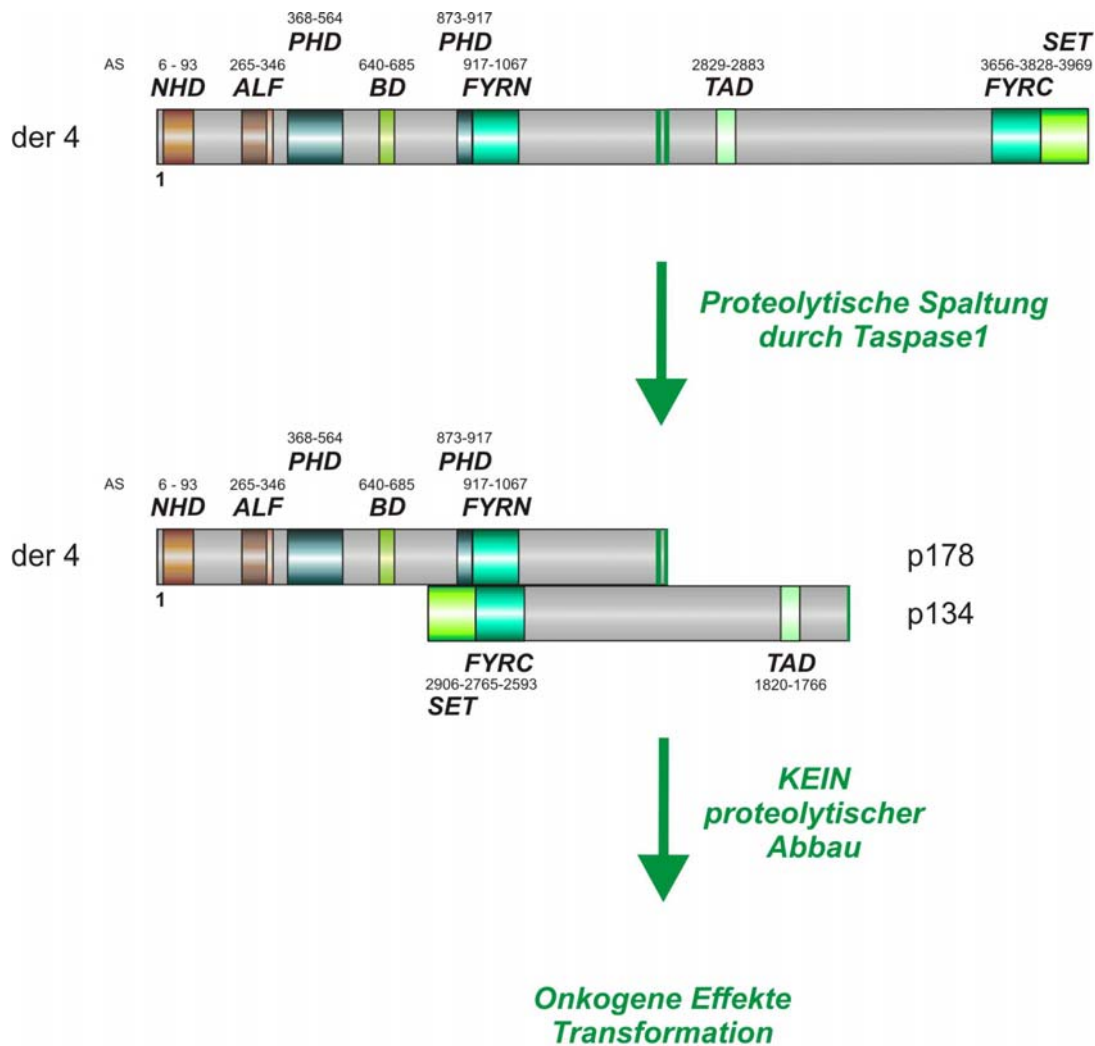


Abb. 2.9: Darstellung des Fusionsproteins AF4•MLL (der4) sowie dessen Prozessierung und Stabilisierung

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der im AF4•MLL Fusionsprotein vorhandenen Proteindomänen sowie die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins. Über die Interaktion der beiden Peptidfragmente p178 und p134 wird das AF4•MLL stabilisiert und dies resultiert in der onkogenen Transformation der Zelle. Die verwendeten Abkürzungen der MLL- bzw. AF4-Proteindomänen sind in Abbildung 2.3 bzw. 2.5 erläutert. Zahlen: Aminosäuren im der4 -Protein, an welchen sich die jeweilige Domäne befindet.

In einem *in vitro* Zellkultur-Modellsystem unserer Arbeitsgruppe konnte das onkogene Potenzial des AF4•MLL Proteins bestätigt werden. MEF-Zellen (*murine embryonic fibroblasts*), die mit AF4•MLL transfiziert wurden, wiesen verstärkte Wachstumsraten und einen Verlust der Kontaktinhibition auf. Diese Eigenschaften wurden auch bei Zellen beobachtet, die mit beiden Fusionsproteinen, AF4•MLL und MLL•AF4, transfiziert wurden. Sie waren jedoch zusätzlich durch eine erhöhte Expression von *Nanog* und *Oct4* gekennzeichnet, welche zusammen die Aufrechterhaltung der Pluripotenz und

der Selbsterneuerung in embryonalen Stammzellen steuern. Als Schlussfolgerung war anzunehmen, dass die t(4;11) Leukämie von der Kombination der Eigenschaften beider reziproker Fusionsproteine abhängt und nicht nur von den Eigenschaften des MLL•AF4 (Gaussmann *et al.*, 2007).

Weitere Bestätigung erhielt diese Annahme durch die retroviralen Transduktions-/Transplantations-Experimente unserer Arbeitsgruppe. Hier resultierte im Mausmodell nur die Transplantation von Stammzellen, die zuvor mit AF4•MLL bzw. mit AF4•MLL und MLL•AF4 transduziert wurden, im Krankheitsphänotyp einer akuten Leukämie (Bursen *et al.*, 2009 submitted).

2.7 Rolle des P-TEFb, NFkB1 und NPM1 in der Transkription und der Zellentwicklung

2.7.1 Der transkriptionelle Elongationsfaktor P-TEFb und dessen Regulation

Der transkriptionelle Elongationsfaktor P-TEFb ist eine entscheidende Komponente des AF4-Proteinkomplexes und setzt sich aus CCNT1 und CDK9 zusammen. Bei CDK9 handelt es sich um die Cyclin-abhängige Kinase 9, welche die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (RNA- Polymerase II CTD) phosphoryliert. Diese C-terminale Domäne beinhaltet 52 Heptapeptid-Folgen der Konsensussequenz YSPTSPS (Phatnani *et al.*, 2006). Sie ist hypophosphoryliert wenn die RNA-Polymerase II anfangs an Gene rekrutiert und in den Präinitiationskomplex am Promotor integriert wird. Die Phosphorylierung am Serinrest 5 durch CDK7, eine Komponente des TFIIH-Komplexes, ist essentiell für die RNA-Polymerase, um den Promotorbereich zu verlassen und in die frühe Phase der Elongation übergehen zu können. In dieser Phase arretiert die RNA-Polymerase zunächst durch die negativen Faktoren DSIF und NELF. Die anschließende Phosphorylierung des Serinrest 2 durch P-TEFb bzw. CDK9 vermittelt den Fortlauf in die produktive Phase der Elongation. Hierbei werden auch DSIF und NELF von P-TEFb phosphoryliert, wodurch NELF dissoziiert und DSIF in einen positiven Faktor umgewandelt wird (Zhou & Yik, 2006).

P-TEFb wird als genereller Transkriptionsfaktor für die effiziente Expression einer Vielzahl von zellulären Genen benötigt, demzufolge muss seine Aktivität exakt reguliert werden, um die Transkription spezifischer Zielgene auf die verschiedenen Phasen des Zellwachstums und der Differenzierung anpassen zu können. Die Funktion des P-TEFb wird somit dynamisch von positiven und negativen Regulatoren kontrolliert. Die Hälfte des nukleären P-TEFb liegt daher in einem inaktiven Komplex gebunden an HEXIM1 und die 7SK snRNA vor, wobei der inhibitorische Effekt des HEXIM1 von der 7SK snRNA abhängig ist und die Bindung über eine direkte Interaktion zwischen HEXIM1 und CCNT1 erfolgt. Der negative Einfluss auf die Kinase- und die transkriptionelle Aktivität des P-TEFb ist demnach wahrscheinlich auch eine Ursache dafür, dass HEXIM1 mit der Hemmung des Wachstums in vielen Zelltypen und Geweben assoziiert ist (Michels *et al.*, 2004; Yik *et al.*, 2003; Zhou & Yik, 2006). Des Weiteren wurde HEXIM1 als Interaktionsfaktor des N-CoR identifiziert und nachgewiesen, dass CDK9 durch N-CoR und dessen assoziierter Histondeacetylase HDAC3 reguliert wird. In diesen Untersuchungen wurde ergänzend belegt, dass eine Acetylierung des CDK9 durch p300 dessen Kinaseaktivität erhöht (Fu *et al.*, 2007).

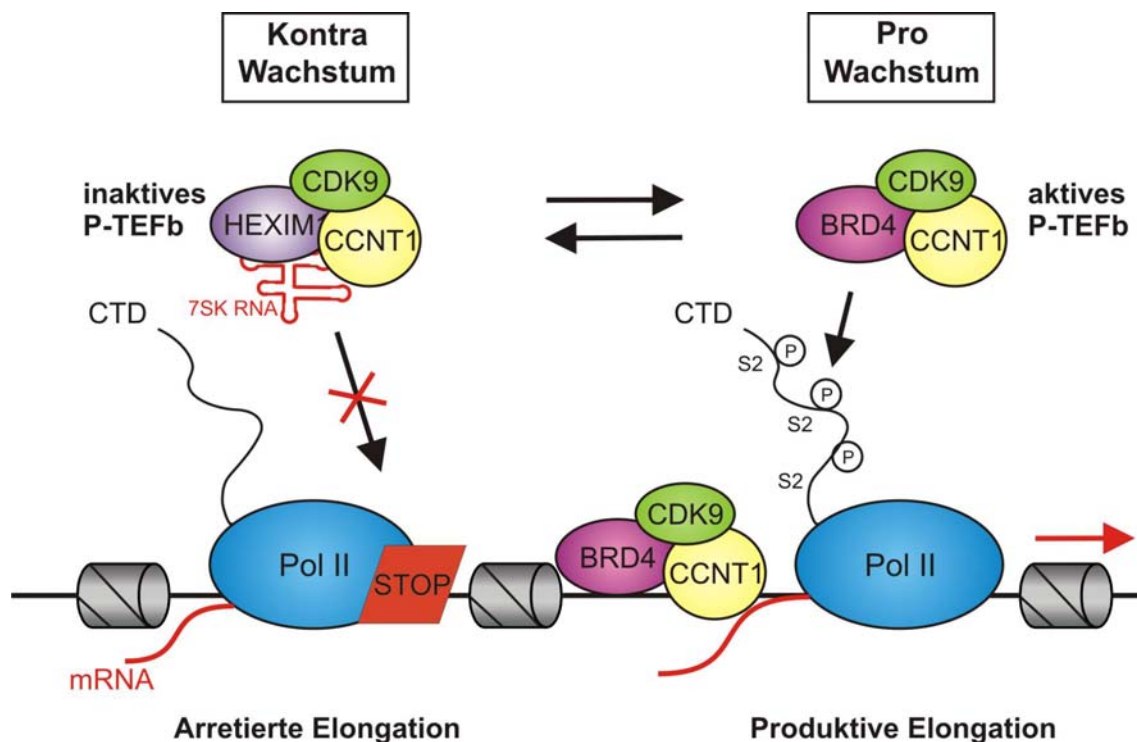


Abb. 2.10

Abb. 2.10: Mechanismen der Regulation des P-TEFb und dessen Rolle in der Transkription.

In dieser Abbildung ist die positive bzw. negative Regulation des P-TEFb durch Brd4 bzw. HEXIM1/7SK RNA dargestellt, sowie dessen Einfluss auf den Fortlauf der Transkription. **CTD**: C-terminale Domäne; **S2**: Serinrest 2 der Heptapeptid-Folgen der Konsensussequenz YSPTSPS in der C-terminalen Domäne; **P**: Phosphorylierung (geändert nach Zhou & Yik, 2006).

Im Gegensatz zur Wirkung des HEXIM1-7SK snRNA Komplexes resultiert die Interaktion mit dem Bromodomänen-Protein BRD4 in der Ausbildung eines transkriptionell aktiven P-TEFb-Komplexes, in dem die andere Hälfte des nukleären P-TEFb gebunden ist. Das BRD4-Protein ist in der Lage durch seine Bromodomänen an acetylierte Histone zu binden und wird aufgrund dessen mit der Entschlüsselung des Histoncodes assoziiert (Zeng *et al.*, 2002). In Übereinstimmung mit dieser Auffassung wurde gezeigt, dass BRD4 über eine direkte Interaktion mit acetyliertem Histon H3 und H4 an aktiv transkribierte Chromatinregionen bindet (Dey *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist BRD4 befähigt die Bindung an das Chromatin während der Mitose aufrechtzuerhalten, so dass eine positive Rolle des Proteins in der Übermittlung eines epigenetischen Gedächtnisses über die Zellteilung hinaus angenommen werden kann (Dey *et al.*, 2000 und 2003).

Die beiden Bromodomänen, welche für die Bindung an die Histone notwendig sind, sind ebenfalls für die Interaktion mit P-TEFb verantwortlich. Die Untersuchung der Interaktionsdomäne des P-TEFb zeigte, dass lediglich CCNT1 mit BRD4 interagiert, CDK9 jedoch nicht (Jang *et al.*, 2005). Über die Bindung an BRD4 kann P-TEFb nun an diverse Promotoren rekrutiert werden, um dort die transkriptionelle Elongation zu vermitteln (Jang *et al.*, 2005, Yang *et al.*, 2005). Weitere Studien zeigten, dass gleichzeitig zur Rekrutierung des P-TEFb an die Chromosomen der Level der BRD4-P-TEFb-Interaktion in Zellen, welche von der späten Mitose zur frühen G₁-Phase fortschreiten, ansteigt. Diese Rekrutierung des P-TEFb an die mitotischen Chromosomen vor dem M/G₁-Übergang ist entscheidend für die Expression von Schlüsselgenen der G₁-Phase sowie den Fortlauf des Zellzyklus in dieser Phase (Yang *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde eine Gruppe von sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NFκB1 (Barboric *et al.*, 2001) und Myc (Eberhardy *et al.*, 2001; Kanazawa *et al.*, 2003), als P-TEFb-assoziiierende

Faktoren beschrieben, so dass ebenso über diese Faktoren eine Rekrutierung des P-TEFb an spezifische Zielgene möglich ist.

2.7.2 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB1 und dessen Funktion

Die Rel/NFκB Familie eukaryoter Transkriptionsfaktoren beinhaltet strukturell verwandte Proteine, die Homo- und Heterodimere ausbilden können (Chen & Gosh, 1999). Das bekannteste Mitglied dieser Proteinfamilie ist der Transkriptionsfaktor NFκB1, welcher vorwiegend als Heterodimer zwischen RelA (p65) und p50 vorliegt (Barkett & Gilmore, 1999). In der inaktiven cytoplasmatischen Form interagiert der Heterodimer mit dem Inhibitor IκB. Als Reaktion auf zahlreiche Stimuli erfolgt die Phosphorylierung zweier konservierter Serinreste am N-Terminus des IκB, welche in einer Polyubiquitinylierung sowie dem anschließenden Abbau des IκB resultiert. Infolgedessen transloziert NFκB1 in den Nukleus, um dort die Expression einer Vielzahl an Zielgenen zu stimulieren (Karin & Ben-Neriah, 2000). Auf den Abbau des IκB folgend wird zusätzlich die Proteinkinase A aktiviert, welche die p65 Untereinheit des NFκB1 phosphoryliert. Durch diese Phosphorylierung wird die für eine effiziente NFκB1-abhängige Transkription notwendige Interaktion zwischen CREBBP/p300 und NFκB1 ermöglicht (Zhong *et al.*, 1998).

Die aktive Form des NFκB1 ist in der Lage über 150 Gene zu regulieren, zu denen inflammatorische Cytokine, Chemokine, Immunrezeptoren, Zelladhäsions-Moleküle sowie Transkriptionsfaktoren wie das Proto-Onkogen *c-myc* und der Tumorsuppressor *p53* gehören (Pahl, 1999). Studien von Barboric *et al.* zeigten unter Verwendung eines P-TEFb-Inhibitors, dass die Aktivierung der Transkription der Gene durch RelA zusätzlich von P-TEFb abhängig ist. In Folge dessen wird P-TEFb beispielsweise für die NFκB1-abhängige Transkription antiapoptotischer Gene benötigt, so dass die Kinaseaktivität des P-TEFb erforderlich ist um die Zellen vor der Apoptose zu bewahren. Die Interaktionsdomäne zwischen NFκB1 und CCNT1 konnte auf die ersten 250 Aminosäuren des CCNT1 beschränkt werden (Barboric *et al.*, 2001). Ergänzend belegen neuere Untersuchungen, dass BRD4, welches mit P-TEFb interagieren

kann, als Co-Aktivator des NFκB1 fungiert. Es bindet an NFκB1, wenn dessen RelA Untereinheit am Lysinrest 310 acetyliert vorliegt, wodurch BRD4 die transkriptionelle Aktivität des NFκB1 sowie die Expression einer Reihe an inflammatorischen Genen verstärkt (Huang *et al.*, 2008).

Neben dem Einfluss des NFκB1 auf antiapoptotische und inflammatorische Gene, ist es ebenso an Prozessen der zellulären Wachstumskontrolle und der Entstehung von Neoplasien beteiligt. Es induziert beispielsweise die Zellproliferation und den Fortlauf des Zellzyklus, indem es die Expression von Targetgenen wie *c-Myc* oder *CyclinD1* reguliert (Pahl, 1999; Rayet & Gelinas, 1999). In zahlreichen verschiedenen Krebszellen wurden Mechanismen der konstitutiven Aktivierung des NFκB1 oder der Inaktivierung des IκB durch Mutationen nachgewiesen. Die konstitutive Aktivierung der IκB-Kinase, welche zum Abbau des IκB führt, konnte mitunter in Fällen der akuten lymphatischen Leukämie bei Kindern beobachtet werden (Li & Stark, 2002).

2.7.3 Regulation der Transkription und des Zellwachstums über NPM1

Nukleophosmin, auch NPM1 oder B23 genannt, wird ubiquitär exprimiert und ist ein Mitglied der Nukleoplasmin-Proteinfamilie nukleärer Chaperone (Michalik *et al.*, 1981). Es handelt sich um ein Phosphoprotein, welches schnell zwischen dem Nukleoplasma und dem Zytoplasma pendeln und somit als Chaperon für Nukleinsäuren und Proteine fungieren kann (Borer *et al.*, 1989; Szebeni & Olson, 1999). Biochemische Untersuchungen zeigten, dass es in der Lage ist als Chaperon die falsche Faltung bzw. die Aggregation von Zielproteinen zu verhindern (Szebeni & Olson, 1999) sowie als Histon-Chaperon die Assemblierung und Disassemblierung zu vermitteln (Okuwaki *et al.*, 2001). Zusätzlich werden ihm Funktionen in der Ribosomenbiogenese (Borer *et al.*, 1989), der Zellzykluskontrolle, der Zelldifferenzierung und der Apoptose zugesprochen (Hsu & Yung, 1998; Liu & Yung, 1998; You *et al.*, 1999). Im Zusammenhang mit der Rolle in der Zellzykluskontrolle konnte in neuesten Untersuchungen eine Interaktion mit dem Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor *p21* und dessen positive posttranslationale Regulation durch NPM1 festgestellt werden (Xiao *et al.*, 2009).

Die Deregulation oder Überexpression des Nukleophosmin ist mit verschiedensten Krebsarten assoziiert und ist eine weit verbreitete genetische Veränderung in hämatopoetischen Tumoren (Grisendi *et al.*, 2006). Es können beispielsweise chromosomale Translokationen im B23-Genlocus oder „*frame shift*“ Mutationen in der C-terminalen Region des B23 auftreten (Okuwaki, 2008). NPM1 Mutationen sind die häufigste genetische Läsion, welche bis heute in *de novo* akuten myeloischen Leukämien identifiziert wurde. Ein deutliches Charakteristikum dieser Mutationen, ist ihre aberrante Lokalisation in das Zytoplasma der leukämischen Zellen (Grummit *et al.*, 2008). Im Zusammenhang mit dieser mutierten zytoplasmatischen Form des NPM1 wurde darüber hinaus im Vergleich zu unmutiertem NPM1 ein deutlich abweichendes Expressionsmuster an mikroRNAs nachgewiesen; dies beinhaltet sowohl erhöhte als auch verringerte Expressionslevel einiger mikroRNAs. Ein niedrigeres Expressionslevel weisen mitunter mikroRNAs auf, welche verschiedene *HOX* Gene ansteuern (Garzon *et al.*, 2008).

Des Weiteren resultiert eine Überexpression des NPM1 in einer verstärkten Proliferation sowie in einer Onkogen-vermittelten Transformation. Dies kann unter anderem auf eine Stimulierung der Ribosomensynthese oder eine Hemmung der Apoptose zurückgeführt werden (Grisendi *et al.*, 2006). Neue Untersuchungen zeigten ergänzend, dass NPM1 über eine direkte Interaktion für die onkogene Aktivität des c-Myc entscheidend ist, sowie, dass eine Überexpression des NPM1 die c-Myc induzierte Hyperproliferation und Transformation drastisch verstärkt (Li *et al.*, 2008).

Neben dem Einfluss auf die Expression von c-Myc Zielgenen konnte der Nachweis erbracht werden, dass Nukleophosmin eine Rolle in der Regulation der Promotor-Aktivität des mit Zellwachstum verbundenen Transkriptionsfaktors E2F1 spielt. Diese Funktion wird durch das Zusammenspiel der NPM1-abhängigen Promotorbindung von NFkB1, E2F1 und pRB vermittelt. Hierbei dienen E2F1 und NFkB1, welches mit NPM1 interagiert, wahrscheinlich als Faktoren der Erhaltung bzw. Aktivierung, während pRB sich reprimierend auf die E2F1 Promotor-Aktivität auswirkt (Lin *et al.*, 2006). Eine weitere Funktion des Nukleophosmin wird durch dessen Interaktion mit HEXIM1 gewährleistet

und besteht in dessen negativer Regulation. Die Überexpression des NPM1 führt in diesem Kontext zu einem verringerten HEXIM1 Proteinlevel durch Proteasom-abhängigen Abbau während die P-TEFb-abhängige Transkription steigt. Es ist demnach anzunehmen, dass die Fehlregulation der RNA-Polymerase II abhängigen Transkription einen Beitrag zur Ausbildung einer AML leisten könnte (Gurumurthy *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu diesen Aufgaben des NPM1 stehen weitere Studien, welche NPM1 eine Rolle in der Induktion der Apoptose und im Wachstumsarrest von Zellen zusprechen. Diese Funktionen sind wahrscheinlich auf eine Kontrolle des p53-Signalwegs zurückzuführen und weisen auf Eigenschaften des NPM1 als Tumorsuppressor hin (Colombo *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005).

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Chromosomale Translokationen des *MLL*-Gens (11q23) sind mit der Entwicklung von Hochrisiko-Leukämien mit sehr schlechter Prognose verbunden. Die häufigste chromosomale Translokation ist die t(4;11) Translokation welche in einer akuten lymphatischen Leukämie resultiert (Daser & Rabbits, 2005). Die Funktionen der dabei entstehenden chimären Fusionsprodukte MLL•AF4 und AF4•MLL bzw. der mit ihnen assoziierten Proteinkomplexe sowie ihr Beitrag zur Leukämogenese konnten bis heute nicht ausreichend geklärt werden.

Im Zusammenhang mit der Frage nach den Wirkungsmechanismen der Fusionsproteine und ihrer Komplexe wurden zwei unterschiedliche Konzepte betrachtet. Das eine Konzept geht von einem Funktionsgewinn durch die Anwesenheit der Fusionsproteine aus, welcher an Veränderungen im Genexpressionsprofil der betroffenen Zellen geknüpft ist (Gaussmann *et al.*, 2006). Das zweite Modell hingegen bezieht sich auf eine mögliche Konkurrenz zwischen den Proteinkomplexen der Fusionsproteine und den Wildtyp-Proteinkomplexen, wodurch die Funktion der Wildtyp-Proteinkomplexe beeinträchtigt wird.

Ziel dieser Arbeit war nun die Charakterisierung der Fusionsproteinkomplexe des MLL•AF4 bzw. AF4•MLL, deren Vergleich mit den Wildtyp-Proteinkomplexen des MLL bzw. AF4 sowie die Aufklärung ihrer Funktion während der Leukämogenese. Zu diesem Zweck sollten die Expressionskassetten für MLL•AF4 und AF4•MLL in Vektoren kloniert werden, welche mit einem C-terminalen Strep-Tag fusioniert waren. Anschließend sollten transiente Transfektionen und die Expression dieser Konstrukte in 293T-Säuger-Zellen erfolgen. Hierbei wurde zusätzlich ein Vektor verwendet, der die kodierende Sequenz des AF4 mit C-terminalen Strep-Tag beinhaltet, um somit neben dem Vergleich mit dem weitgehend aufgeklärten MLL Proteinkomplex auch den Vergleich mit dem AF4-Proteinkomplex zu ermöglichen.

Mit Hilfe des C-terminalen Strep-Tags sollte die Reinigung der Proteinkomplexe über Affinitätschromatographie durchgeführt werden. Die Identifizierung der gereinigten Proteine sowie die Verifizierung bekannter bzw. neuer Komplexpartner sollten mittels massenspektrometrischer Analysen, Western Blot-Analysen und Immunopräzipitationen erfolgen. Aufgrund der festgestellten Komposition der Proteinkomplexe sollten abschließend Rückschlüsse auf ihre Funktion und ihren Beitrag zum pathologischen Mechanismus der t(4;11) Translokation gezogen werden.

3 Ergebnisse

In vorausgegangenen Untersuchungen zu den Eigenschaften der Fusionsproteine resultierte die Expression des MLL•AF4 in verringertem Wachstum und in einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Caslini *et al.*, 2004; Gaussmann *et al.*, 2007). Ein konditionales MLL•AF4 *knock in* Mausmodell belegte darüber hinaus die Entwicklung einer ALL oder AML sowie eine ektope H3K79 Methylierung (Krivtsov *et al.*, 2008). Das AF4•MLL-Protein (der4) hingegen sowie die Überexpression des AF4-N-Terminus und des AF4-Wildtyp-Proteins führten in Studien an MEF-Zellen zum Verlust der Kontaktinhibition und zur Wachstumstransformation der Zellen (Bursen *et al.*, 2004). In retroviralen Transduktions-/Transplantations-Experimenten wiesen rezipiente Mäuse, welche mit AF4•MLL oder doppelt-transduzierten (MLL•AF4 und AF4•MLL) Stammzellen transplantiert wurden, eine proB ALL, eine B/T biphänotypische akute Leukämie oder eine „*mixed lineage leukemia*“ (MLL) auf (Bursen *et al.*, 2009 submitted).

Um ergänzend zu diesen Ergebnissen die molekularen Grundlagen dieser Charakteristika sowie der Auswirkungen der Fusionsproteine auf das Wachstum der Zelle besser zu verstehen, sollte die Komposition der durch die Fusionsproteine ausgebildeten Multiproteinkomplexe aufgeklärt und mit der Zusammensetzung der Wildtyp-Proteinkomplexe verglichen werden.

3.1 Nachweis und Isolierung des AF4-/AF4•MLL-Proteinkomplexes

3.1.1 Größenbestimmung der Proteinkomplexe mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie

Um zunächst die Größe der Multiproteinkomplexe zu ermitteln, wurde eine Größenausschlusschromatographie (GAC) durchgeführt, welche die Trennung von Makromolekülen aufgrund ihres Molekulargewichts ermöglicht. Dafür wurden 293T Zellen mit Expressionsvektoren für AF4 und AF4•MLL (pTarget-AF4 bzw. pTarget-der4) transient transfiziert. Eine Transfektion mit einem MLL-

AF4-Plasmid wurde nicht durchgeführt, da ein Nachweis des Proteins unter Verwendung verschiedener Expressionskonstrukte nicht möglich war.

Nach 48-stündiger Expression, inklusive einer 16-stündigen Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132, wurde ein Proteinlysats hergestellt. Dieses Lysat wurde über eine Sepharose-Säule getrennt und anschließend in 36 Fraktionen aufgefangen. Proben der auf diese Weise erhaltenen Fraktionen wurden in Western Blot-Experimenten auf die Anwesenheit des AF4- bzw. AF4-MLL-Proteins untersucht. In der Abbildung 3.1 A und C sind als Ausschnitt die Fraktionen dargestellt, in denen eine Identifizierung des AF4- bzw. AF4-MLL-Proteins möglich war.

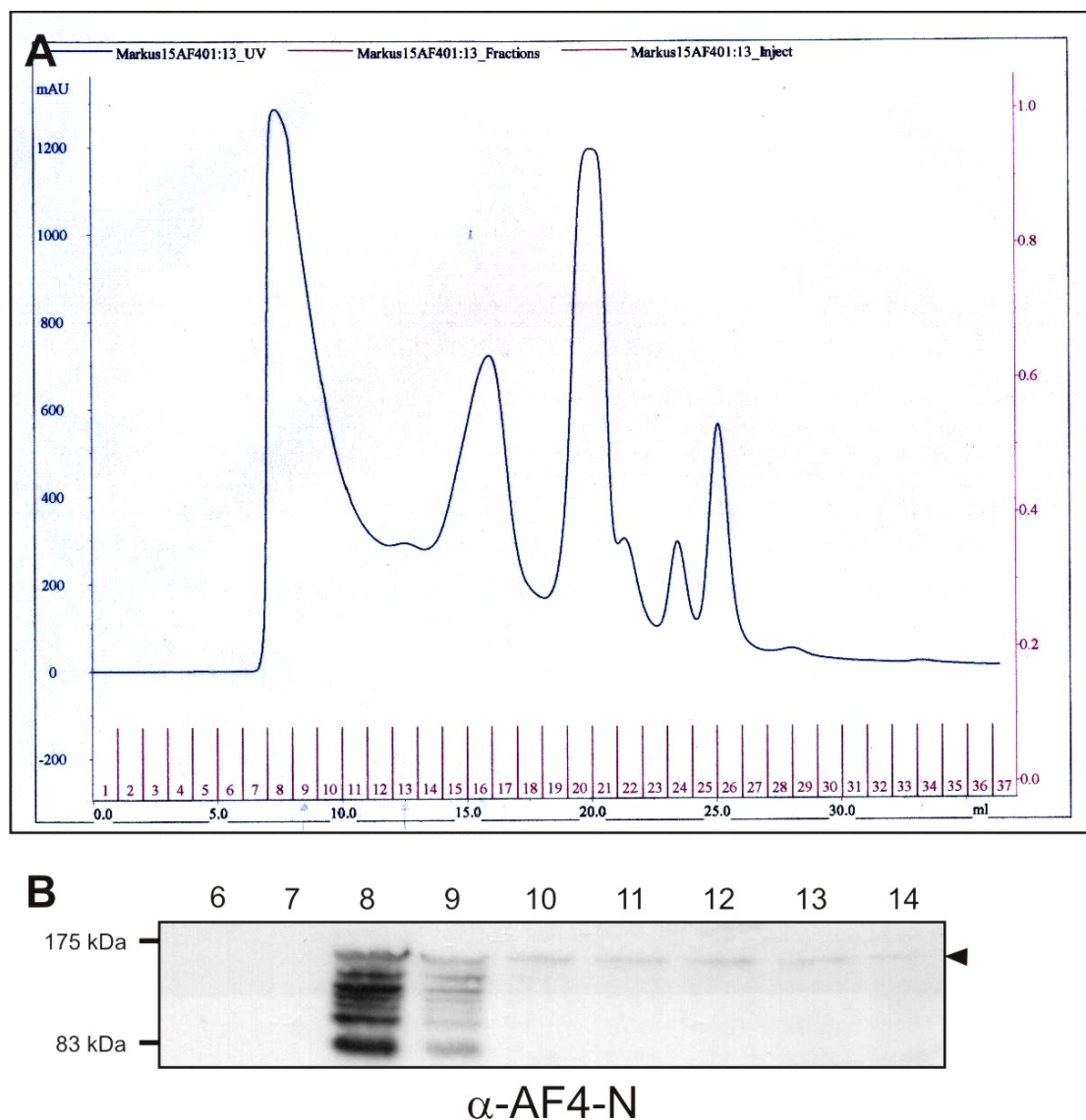


Abb. 3.1

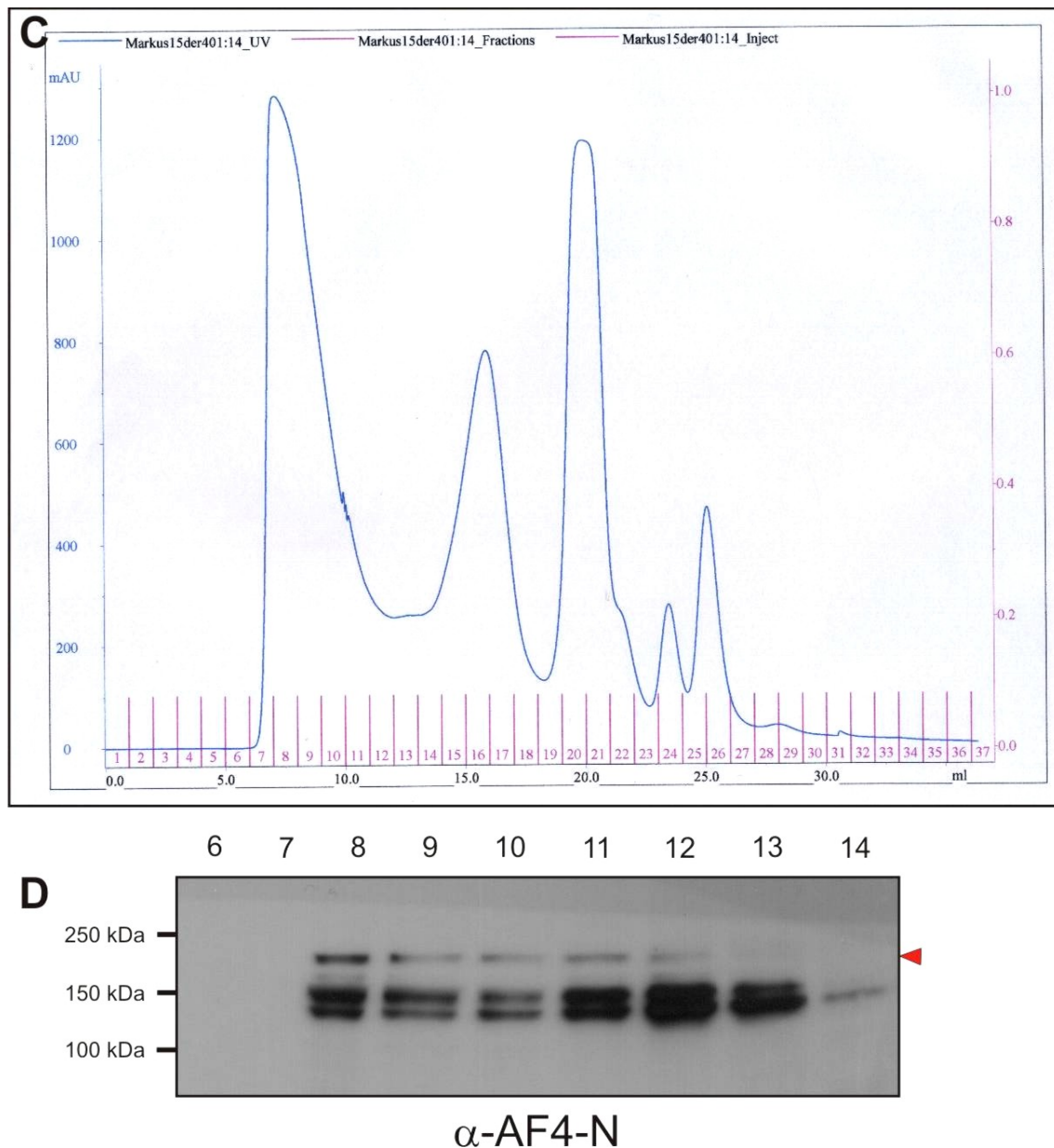


Abb. 3.1: Größenausschlusschromatographie (GAC) des AF4- bzw. AF4•MLL-Multi-proteinkomplexes

Als Probe diente Zelllysate aus transient mit pTarget-AF4 bzw. pTarget-der4 transfizierten Zellen. Die Chromatographie erfolgte über eine Superose-6 10/300-Säule, wobei jeweils 36 Fraktionen aufgefangen wurden.

A/C: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des AF4(A)- bzw. AF4•MLL(C)-Proteinkomplexes. Y-Achse: UV-Absorption bei $\lambda = 254\text{nm}$ [mAU]; x-Achse: Fraktionen 1-36.

B/D: Western Blot-Analysen der Fraktionen 6-14 der Größenausschlusschromatographien. Über die Detektion mittels α -AF4-N-Antikörper konnte das AF4(B)- bzw. AF4•MLL(D)-Protein in SEC-Fraktionen nachgewiesen werden. schwarzer Pfeil: AF4-Protein (131 kDa, apparent bei 175 kDa); roter Pfeil: N-terminales Fragment p178 des AF4•MLL; Proteinstandard an der linken Seite des Western Blots.

Die Detektion im Western Blot wurde über einen monoklonalen Antikörper (α -AF4-N) unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, welcher gegen den N-Terminus des AF4-Proteins gerichtet ist. Um eine spezifische und effektive Detektion zu gewährleisten, wurde der Antikörper zuvor aus Zellüberstand der zugehörigen Hybridomazelllinie unter Verwendung von Protein-G-Sepharose gereinigt und dabei zusätzlich konzentriert. Der Vergleich mit Chromatographieergebnissen von Standardproteinen erlaubte abschließend eine annähernde Bestimmung der Größe der Proteinkomplexe des AF4 und des AF4•MLL.

Die Western Blot-Analysen der SEC-Fractionen des AF4 wiesen das stärkste Signal in Fraktion 8 und schwächere Signale in den Fraktionen 9-13 auf. Trotz seines Molekulargewichts von 131 kDa erfolgt die Detektion des AF4-Proteins apparent bei 175 kDa. Diese Diskrepanz kann unter anderem auf post-translationale Modifikationen wie beispielsweise Serin-Phosphorylierungen des AF4 zurückgeführt werden. Bei den Signalen geringerer Molekulargewichte handelt es sich hauptsächlich um Abbaufragmente des AF4-Proteins, welche durch massenspektrometrische Experimente bestätigt werden konnten (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich mit den SEC-Standardproteinen ergab demnach für den AF4-Proteinkomplex ein Molekulargewicht von bis zu ca. 2 MDa.

Für die Identifizierung des AF4•MLL-Proteins im Western Blot der zugehörigen SEC-Fractionen wurde ebenfalls der α -AF4-N-Antikörper verwendet, so dass aufgrund der spezifischen Hydrolyse des AF4•MLL durch Taspase1 nur das N-terminale Fragment p178 detektiert werden konnte. Die Detektion des p178 erfolgte in den Fraktionen 8-12. Signale geringerer Molekulargewichte waren wiederum auf Abbauprodukte des Proteins zurückzuführen. Anhand der Größenausschlusschromatographie konnte somit auch für den AF4•MLL-Proteinkomplex ein Molekulargewicht von bis zu ca. 2 MDa ermittelt werden.

3.1.2 Reinigung des AF4-/AF4•MLL-Proteinkomplexes mittels Strep-Tag bzw. Strep- und Flag-Tag

Die Reinigung der Proteinkomplexe des AF4 und des AF4•MLL wurde unter Verwendung eines Strep-Tag-Systems durchgeführt. Dieses System basiert auf der Bindung des Strep-Tags bzw. des mit einem Strep-Tag versehenen Proteins an ein Streptactin-Säulenmaterial sowie auf der folgenden kompetitiven Elution mittels Biotin. Es gewährleistet die native Reinigung von Proteinen bzw. Proteinkomplexen und sollte somit die anschließende Untersuchung der Komposition der Proteinkomplexe ermöglichen.

Für die Durchführung der Reinigung wurden 293T Zellen mit Expressionsvektoren des AF4 und des AF4•MLL transfiziert, welche die Expression des jeweiligen Proteins in Fusion mit einem C-terminalen Strep-Tag ermöglichte (pEXPR-IBA103-AF4/ bzw. -der4). Die Transfektion des Vektors ohne die kodierende Sequenz für eines der beiden Proteine diente als Negativkontrolle. Nach 48-stündiger Expression, inklusive einer 16-stündigen Behandlung mit dem Proteasom-Inhibitor MG132, wurde erneut ein Proteinlysats hergestellt. Im Anschluss an die Zellyse wurde die Probe zunächst an eine Strep-Tactin-Säule oder an eine Strep-Tactin-Suspension gebunden und abschließend der jeweilige Proteinkomplex mit Biotin eluiert.

Im Folgenden wurden die im Verlauf der Reinigung gewonnen Proben über SDS-PAGE mit Coomassie Blau-Färbung oder kolloidaler Coomassie-Färbung (siehe Abbildung 3.2 A und B) sowie über Western Blot-Experimente analysiert (siehe Abbildung 3.2 C-E). Die Western Blot-Analysen der Elutionen beider Proteinkomplexe wiesen erneut Signale geringerer Molekulargewichte auf, welche auf Abbauprodukte der transfizierten und gereinigten Proteine zurückzuführen waren.

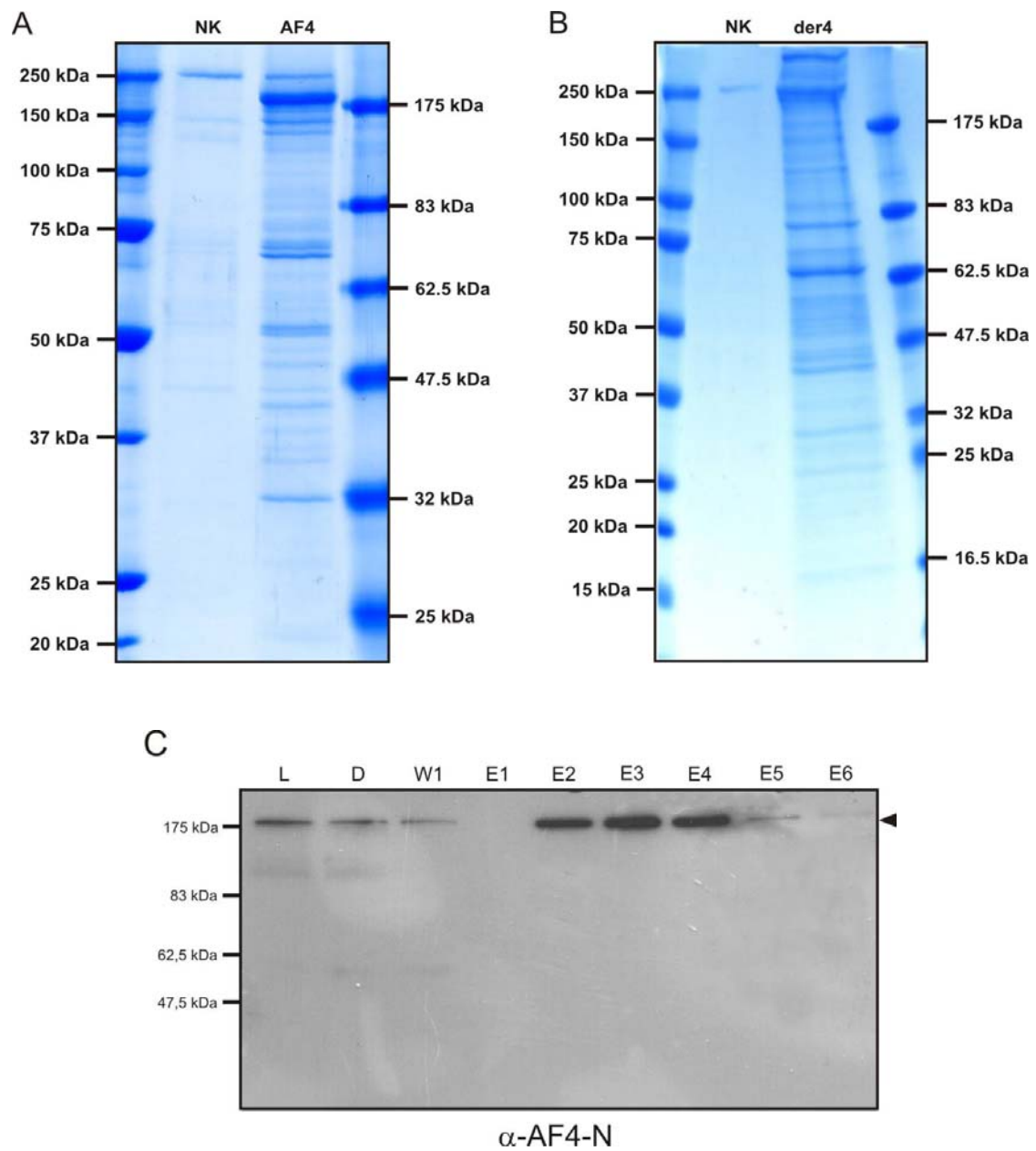


Abb. 3.2

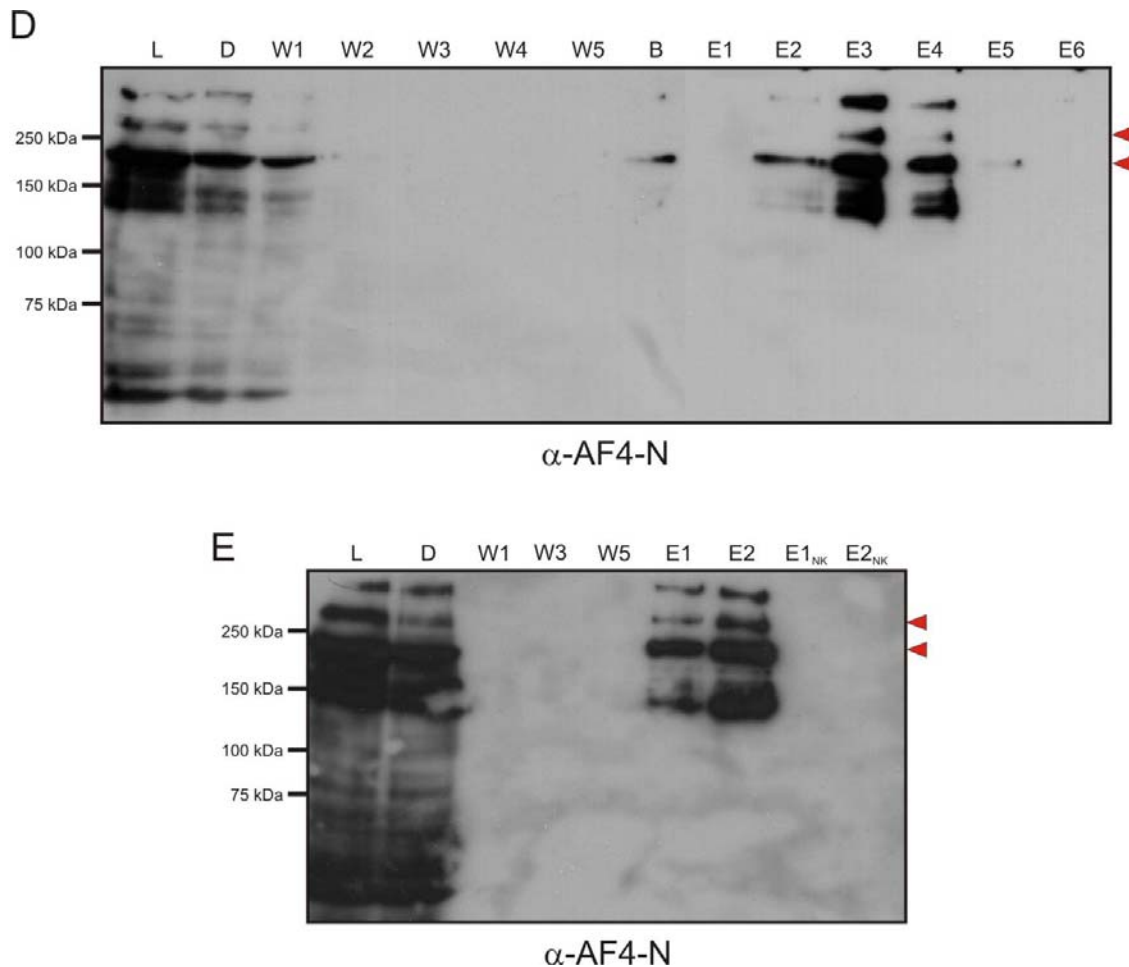


Abb. 3.2: Strep-Tag-Affinitätsreinigung des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteinkomplexes.

Nach transienter Transfektion und der Herstellung eines Proteinlysats, wurden die Proteine AF4 bzw. AF4•MLL über ihren Strep-Tag an eine Strep-Tactin-Säule oder an eine Strep-Tactin-Suspension gebunden. Die Elution erfolgte mittels Biotin. Die Proben aus der Affinitätschromatographie wurden abschließend über SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

A/B: SDS-PAGE (mit kolloidaler Coomassie Färbung und Acrylamidgradienten: Trenngel 7-15 %) der Strep-Tag-Reinigungen des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteinkomplexes über eine Strep-Tactin-Säule. NK: Negativkontrolle. Verschiedene Proteinstandards an den Seiten der SDS-Gele.

C: Western Blot der Reinigung des AF4-Proteinkomplexes über eine Strep-Tactin-Säule. Das AF4-Protein konnte mittels α -AF4-N-Antikörper detektiert werden. schwarzer Pfeil: AF4-Protein (apparent bei 175 kDa); NK: Negativkontrolle. Proteinstandard an der linken Seite des Western Blots.

D/E: Western Blot der Reinigung des AF4•MLL-Proteinkomplexes über eine Strep-Tactin-Säule (D) bzw. mittels Strep-Tactin-Suspension (E). Das N-terminale Fragment p178 des AF4•MLL-Proteins sowie das vollständige AF4•MLL-Protein konnten mittels α -AF4-N-Antikörper detektiert werden. roter Pfeil: N-terminales Fragment p178 des AF4•MLL bzw. vollständiges AF4•MLL-Protein p320; NK: Negativkontrolle. Proteinstandard an der linken Seite der Western Blots.

Die Elution der Reinigung über die Strep-Tactin-Suspension konnte in weiteren Western Blot-Analysen zur Identifizierung der Komplexpartner eingesetzt werden. Im Falle der Reinigung über eine Strep-Tactin-Säule wurden die

Elutionen mit dem stärksten Signal für das AF4- bzw. AF4•MLL-Protein (meist Elutionen 2-4) vereinigt. Diese Elutionen wiesen weniger unspezifisch gebundene Proteine auf, so dass sie neben den Western Blot-Experimenten ebenso in SDS-Gelen mit Acrylamidgradienten (siehe Abbildung 3.2 A und B) sowie in massenspektrometrischen Analysen eingesetzt wurden. Die Verwendung des Acrylamidgradienten für die SDS-PAGE ermöglichte eine verbesserte Trennung von sehr großen und sehr kleinen Proteinen der Proteinkomplexe gleichzeitig in einem Gel. Um die Reinigung weiter zu optimieren und die Menge an unspezifischen Proteinen zu verringern, wurde eine Tandemreinigung über den C-terminalen Strep-Tag und einen zusätzlichen N-terminalen Flag-Tag durchgeführt. Die erhaltenen Elutionen lieferten jedoch keine besseren oder ergänzenden Ergebnisse, so dass die in den nächsten Abschnitten folgenden Daten auf dem Einsatz der Elutionen aus der einfachen Strep-Tag-Reinigung beruhen. Es werden nur konsistente Daten präsentiert, welche auf mehrfach wiederholten Reinigungen beruhen.

Die Reinigung des MLL•AF4-Proteinkomplexes bzw. der Nachweis des MLL•AF4-Proteins in einer Elution der Reinigung war unter den verwendeten Bedingungen nicht möglich. Dies kann auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein, wie beispielsweise der Mangel an einem optimalen Antikörper, der eine effiziente Detektion ermöglicht. Des Weiteren ist anzunehmen, dass die Zellen, welche erfolgreich transfiziert wurden und das MLL•AF4-Protein exprimieren, im Wachstum arretieren, während die anderen Zellen fortlaufend wachsen. Letztendlich könnte dies in einer zu geringen Anzahl an transfizierten Zellen für die Zelllyse resultieren, so dass die Menge an MLL•AF4-Protein in der Probe unter die Nachweisgrenze fällt. Der Einsatz eines induzierbaren Systems in Form eines hitzeinduzierbaren Promotors sollte dies verhindern. Dies war jedoch nicht erfolgreich, da sich die Expressionseffizienz unter den getesteten Bedingungen als nicht ausreichend erwies.

3.2 Zusammensetzung der gereinigten Multiproteinkomplexe

3.2.1 Nachweis der AF4-/AF4•MLL-Komplexparker anhand von Western Blot-Analysen

Nach dem Abschluss der Reinigung und dem Nachweis des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteins in der Elution, wurden eine Reihe von Western Blot-Analysen zur Identifizierung der Komplexparker durchgeführt. In diesen Experimenten wurden die Elutionen gegen eine Negativkontrolle unter Verwendung entsprechender Antikörper auf die Anwesenheit bekannter und potentiell neuer Mitglieder der Proteinkomplexe untersucht.

Die Experimente zum Nachweis von Mitgliedern des MLL-Proteinkomplexes ergaben wie zu erwarten ausschließlich negative Resultate für den gereinigten AF4-Proteinkomplex. Die Betrachtung der Ergebnisse des AF4•MLL-Proteinkomplexes zeigte, dass Mitglieder des MLL-Proteinkomplexes, welche über den C-Terminus des MLL-Proteins binden, ebenso im AF4•MLL-Proteinkomplex enthalten sind (siehe Abbildung 3.3 A). Auf diese Weise konnte die Interaktion von ASH2L, RBBP5 und WDR5 mit der SET-Domäne nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Untersuchungen zum SET-Domänen-Komplex, welcher in der Lage ist H3K4-Trimethylierung zu vermitteln (Nagy *et al.*, 2002; Wysocka *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte sowohl die Anwesenheit von HCF-1 und HCF-2, die über den SET-Domänen-Komplex binden können, als auch die Gegenwart von CREBBP im AF4•MLL-Proteinkomplex belegt werden. Eine Interaktion mit MOF, HIP-2, RING2 (Dou *et al.*, 2005), INI-1, GADD34 (Adler *et al.*, 1997 und 1999) oder E2F-Faktoren (Tyagi *et al.*, 2007) konnte hingegen nicht verifiziert werden.

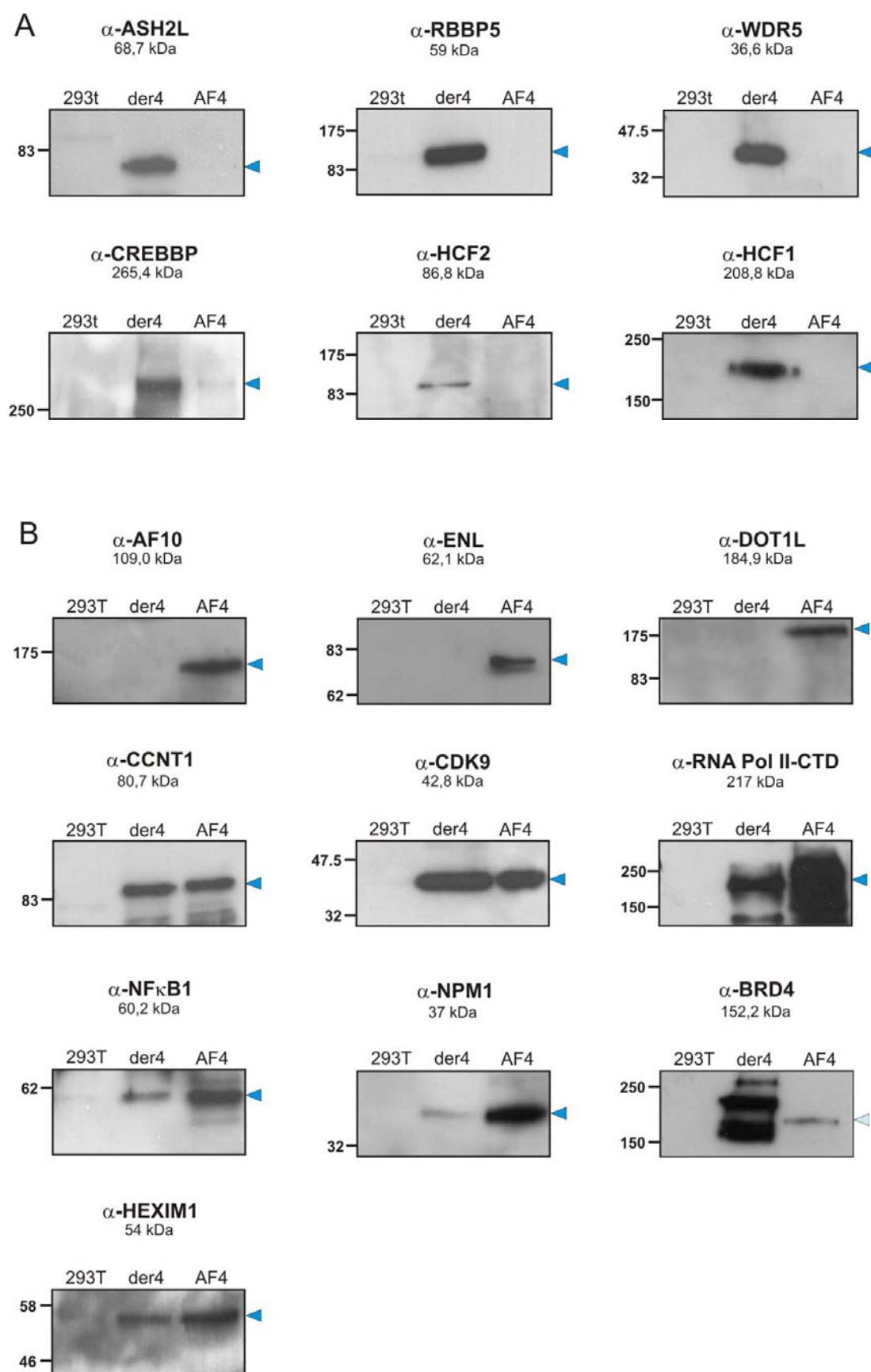


Abb. 3.3

Abb. 3.3: Identifizierung bekannter und neuer Komplexpартner des AF4- bzw. des AF4•MLL-Proteinkomplexes.

Elutionen aus den Reinigungen der Proteinkomplexe wurden in Western Blot-Experimenten eingesetzt, in denen Antikörper gegen bekannte Komplexpартner aus dem AF4- und MLL-Proteinkomplex sowie Antikörper gegen potentielle neue Komplexpартner verwendet wurden.

A: Western Blots zum Nachweis von Mitgliedern des MLL-Proteinkomplexes im gereinigten AF4-Wildtyp- bzw. AF4•MLL-Proteinkomplex. Detektion mittels entsprechenden Antikörpers gegen den jeweiligen Komplexpартner. blaue Pfeile: detektierter Komplexpартner; 293T: Negativkontrolle; Proteinstandard an der linken Seite des Western Blots; Zahlen unter dem Namen des verwendeten Antikörpers: Molekulargewicht des jeweiligen Komplexpартners.

B: Western Blots zum Nachweis von bekannten Mitgliedern des AF4-Proteinkomplexes und potentiellen neuen Komplexpартnern im gereinigten AF4-Wildtyp- bzw. AF4•MLL-Proteinkomplex. Detektion mittels entsprechenden Antikörpers gegen den jeweiligen Komplexpартner. blaue Pfeile: detektierter Komplexpартner; hellblauer Pfeil: mögliche Kreuzreaktion des Brd4-Antikörpers mit AF4 bzw. der4; 293T: Negativkontrolle; Proteinstandard an der linken Seite des Western Blots; Zahlen unter dem Namen des verwendeten Antikörpers: Molekulargewicht des jeweiligen Komplexpартners.

In den Untersuchungen zur Identifizierung der Mitglieder des AF4-Proteinkomplexes konnten nahezu alle bisher bekannten Komplexpартner nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.3 B). Die für den N-Terminus belegten Interaktionen zu P-TEFb (CDK9 und CCNT1) und der RNA-Polymerase II (Bitoun *et al.*, 2007) sowie die C-terminalen Interaktionen zu ENL, AF10 und DOT1L (Bitoun *et al.*, 2007; Zeisig *et al.*, 2005) konnten bestätigt werden. Die Anwesenheit des Polycomb-Proteins Pc3 (Garcia-Cuellar *et al.*, 2001) konnte jedoch nicht belegt werden. Zusätzlich war der Nachweis des AF5 (Mueller *et al.*, 2007) als weiteres Mitglied der ALF-Proteinfamilie im Western Blot aufgrund von Kreuzreaktionen des Antikörpers mit dem AF4-Protein nicht möglich. Über die Identifizierung bekannter Proteine hinaus wurden unter anderem aufgrund von Literaturrecherchen weitere potentielle Komplexpартner getestet. Auf diese Weise konnten NFκB1 (Barboric *et al.*, 2001), NPM1 (Lin *et al.*, 2006), BRD4 (Jang *et al.*, 2005) und HEXIM1 (Michels *et al.*, 2004; Yik *et al.*, 2003) als neue Komplexpартner des AF4-Proteinkomplexes identifiziert werden. Eine Bindung des N-Cor-Komplexes (Fu *et al.*, 2007) konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis des BRD4 als Aktivator des P-TEFb war jedoch nach den Western Blot-Experimenten noch nicht als eindeutig anzusehen, da der verwendete Antikörper ein zum AF4- bzw. AF4•MLL-Protein sehr ähnliches Bandenmuster detektierte, so dass eine Kreuzreaktion nicht auszuschließen war.

Die Identifizierung der Komplexpartner des AF4-Proteinkomplexes als Komponenten des gereinigten AF4•MLL-Proteinkomplexes (siehe Abbildung 3.3 B) ergab wie zu erwarten negative Ergebnisse für ENL, AF10 und DOT1L, da die C-terminalen Bindungsstellen dieser Proteine im AF4•MLL-Protein nicht beinhaltet sind. Die Proteine hingegen, welche über den AF4-N-Terminus interagieren, konnten ebenso im AF4•MLL-Proteinkomplex bestätigt werden. Es ergaben sich demnach positive Ergebnisse für P-TEFb und die RNA-Polymerase sowie für die neuen Komplexpartner NFκB1, HEXIM1 und NPM1. Die Detektion des NPM1 im AF4•MLL-Proteinkomplex erwies sich jedoch als deutlich schwächer im Vergleich zum AF4-Proteinkomplex. Parallel zu den Ergebnissen des AF4-Komplexes war die Verifizierung des BRD4 wiederum aufgrund einer potentiellen Kreuzreaktion des Antikörpers fragwürdig und der Nachweis des N-CoR-Komplexes nicht möglich.

3.2.2 Identifizierung der AF4-/AF4•MLL-Komplexpartner über Massenspektrometrie

Zur weiteren Identifizierung bekannter und vor allem neuer Komplexpartner des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteins sollten neben den Western Blot-Experimenten auch massenspektrometrische Analysen durchgeführt werden. Dies sollte zunächst durch eine SDS-PAGE mit Acrylamidgradienten, das Ausschneiden von Proteinbanden, einen folgenden „In-Gel-Verdau“ sowie die abschließenden MALDI-MS-Messungen ermöglicht werden. Auf diese Weise konnten jedoch nur die unter den Punkten 3.1.2 und 3.2.2 angenommenen Abbauprodukte des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteins bestätigt werden. Die Verifizierung von Komplexpartnern über diese Methode war nicht erfolgreich. Ein möglicher Grund könnte eine zu geringe Konzentration der Proteine in der Elution gewesen sein, so dass die Menge des jeweiligen Komplexpartners in der SDS-PAGE unter der Nachweisgrenze lag und somit nicht sichtbar war.

Alternativ wurden zur Identifizierung der Komplexpartner die Elutionen 2-4 der Reinigung des AF4-Proteinkomplexes über eine Strep-Tactin-Säule vereinigt, anschließend in einem „In-Lösung-Verdau“ eingesetzt und letztendlich über nLC-MS/MS-Messungen analysiert. Um falsch-positive Ergebnisse zu

vermeiden, wurden alle Daten mit einer Negativkontrolle verglichen, welche unter Verwendung des leeren IBA103-Vektors und der gleichen Reinigungsmethode hergestellt wurde.

Die Ergebnisse der nLC-MS/MS-Messungen des gereinigten AF4-Proteinkomplexes zeigen zunächst mit 106 identifizierten Peptiden einen deutlichen Nachweis des AF4-Proteins (siehe Tabelle 1). Es war auffällig, dass in den LC-Messungen für den AF4-Proteinkomplex aufgrund zahlreicher cytosolischer und mitochondrialer Verunreinigungen weit mehr Proteine identifiziert wurden als für den AF4•MLL-Proteinkomplex (411 im Vergleich zu 82; siehe Anhang 7.1). Eine mögliche Erklärung könnte die im Vergleich zu AF4•MLL sehr starke AF4-Expression sein, wodurch mehr AF4-Protein gebunden an cytosolische Faktoren vorliegt. Eine endgültige und genaue Erklärung konnte jedoch nicht gefunden werden.

Parallel zu den Western Blot-Experimenten konnten in den LC-Messungen wiederum CDK9, CCNT1 (Bitoun *et al.*, 2007) und ENL (Bitoun *et al.*, 2007; Zeisig *et al.*, 2005) als Komplexpartner bestätigt werden, wohingegen die RNA-Polymerase II, AF10 und DOT1L unter den Bedingungen der massenspektrometrischen Messungen nicht detektierbar waren. Im Gegensatz zu den Western Blot-Analysen war es über die Massenspektrometrie jedoch möglich AF5 als weiteres Mitglied der ALF-Proteinfamilie (Mueller *et al.*, 2007) im AF4-Proteinkomplex nachzuweisen. Als neuer Komplexpartner des AF4-Proteins konnte, neben NPM1 (Lin *et al.*, 2006), die RNA-Helikase DDX6 nachgewiesen werden. NFκB1, HEXIM1 und BRD4 konnten jedoch nicht bestätigt werden, so dass eine weitere Verifizierung über Immunopräzipitationen erfolgen musste (siehe 3.2.3). Im Falle des NFκB1 könnte dies eventuell auf ungeeignete Fragmente des tryptischen Verdaus zurückzuführen sein.

PROTEIN	AC	MG [kDa]	PI	Σ Peptide
AFF1 (AF4)	P51825	131,4	9,3	106
AFF4 (AF5Q31)	Q9UHB7	127,5	9,3	7
CCNT1 (CyclinT1)	O60563	80,7	8,9	11
CDK9	P50750	42,8	9	12
NPM1	P06748	32,6	4,6	6
ENL	Q03111	62,1	8,8	22
DDX6	P26196	54,4	8,9	9

Tab. 1: nLC-MS-MS-Untersuchungen des AF4-Proteinkomplexes

Tabellarische Darstellung der Ergebnisse aus den nLC-MS-MS-Messungen des AF4-Proteinkomplexes. In der Tabelle sind neben dem Namen des identifizierten Proteins die Akzessionsnummer (AC: accession number), das Molekulargewicht (MG; Einheit: kDa), der Isoelektrische Punkt (PI) und die Anzahl der identifizierten Peptide (Σ Peptide) angegeben. Für die nLC-MS-MS-Läufe wurden die Elutionen 2-4 der Reinigung des AF4-Proteinkomplexes über eine Strep-Tactin-Säule zunächst vereinigt und anschließend in einem „In-Lösung-Verdau“ eingesetzt.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der nLC-MS/MS-Messungen des gereinigten AF4•MLL-Proteinkomplexes, kann das AF4•MLL (der4)-Protein nicht direkt aufgeführt werden, da es sich nicht in der Datenbank befindet. Zur Verifizierung des Proteins in der Reinigung wurden somit C-terminale Peptide des MLL-Proteins (131) und N-terminale Peptide des AF4-Proteins (21) herangezogen (siehe Tabelle 2). Neben den 21 N-terminalen Peptiden des AF4-Proteins konnten jedoch ebenso 23 C-terminale Peptide identifiziert werden, welche auf die Anwesenheit des AF4-Wildtyp-Proteins im AF4•MLL-Proteinkomplex schließen lassen, während keine Peptide für AF5 detektiert wurden. Weitere Untersuchungen unter Verwendung des FelC-Proteins weisen auf eine mögliche Interaktion hin, die von beiden Seiten über N-terminale AF4-Sequenzen erfolgt (Daten nicht gezeigt; Nilson *et al.*, 1997).

Entsprechend der Western Blot-Ergebnisse konnten die Mitglieder des MLL-Proteinkomplexes WDR5, RBBP5 und ASH2L identifiziert werden, welche als SET-Domänenkomplex für die H3K4-Trimethylierungsaktivität verantwortlich sind (Nagy *et al.*, 2002; Wysocka *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte in diesem Zusammenhang auch die Anwesenheit des an ASH2L bindenden DPY-30 belegt werden (Cho *et al.*, 2007). Des Weiteren wurden HCF-1 und HCF-2 als Mitglieder des AF4•MLL-Proteinkomplexes bestätigt, wohingegen CREBBP

massenspektrometrisch nicht nachweisbar war. MOF, HIP-2, RING2 (Dou *et al.*, 2005), INI-1, GADD34 (Adler *et al.*, 1997 und 1999) und die E2F-Faktoren (Tyagi *et al.*, 2007) konnten erneut nicht verifiziert werden.

Parallel zu den Ergebnissen des AF4-Proteinkomplexes konnten Peptide des CDK9, CCNT1 und DDX6 identifiziert werden, während für die RNA-Polymerase II, NFκB1, HEXIM1 oder BRD4 kein Peptid detektiert werden konnte. Die Verifizierung des NPM1 im AF4•MLL-Proteinkomplex fiel erneut schwächer aus als im AF4-Proteinkomplex, da hier nur ein Peptid zugeordnet werden konnte.

PROTEIN	AC	MG [kDa]	PI	Σ Peptide
HRX (MLL)	Q03164	431,8	9,2	131
AFF1 (AF4)	P51825	131,4	9,3	44 (21+23)
CCNT1 (CyclinT1)	O60563	80,7	8,9	3
CDK9	P50750	42,8	9	2
HCFC2 (HCF-2)	Q9Y5Z7	86,8	8,8	2
HCFC1 (HCF-1)	P51610	208,8	7,3	14
WDR5	P61964	36,6	8,5	4
RBBP5	Q15291	59,1	5	4
ASH2L	Q9UBL3	68,7	5,5	4
DPY-30	Q9C005	11,3	4,8	2
NPM1	P06748	32,6	4,6	1
DDX6	P26196	54,4	8,9	4

Tab. 2:nLC-MS-MS-Untersuchungen des AF4•MLL-Proteinkomplexes

Tabellarische Darstellung der Ergebnisse aus den nLC-MS-MS-Messungen des AF4•MLL-Proteinkomplexes. In der Tabelle sind neben dem Namen des identifizierten Proteins die Akzessionsnummer (AC: accession number), das Molekulargewicht (MG; Einheit: kDa), der Isoelektrische Punkt (PI) und die Anzahl der identifizierten Peptide (Σ Peptide) angegeben. Für die nLC-MS-MS-Läufe wurden die Elutionen 2-4 der Reinigung des AF4•MLL-Proteinkomplexes über eine Strep-Tactin-Säule zunächst vereinigt und anschließend in einem „In-Lösung-Verdau“ eingesetzt.

Ein Nachweis von endogenem SIAH (Bursen *et al.*, 2004) in einem der beiden Proteinkomplexe war nicht möglich. Ein möglicher Grund könnte die Stabilisierung des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteins im Multiproteinkomplex sein.

3.2.3 Verifizierung neuer Komplexpартner durch Co-Immunopräzipitationen

Um die über Western Blot-Analysen und massenspektrometrische Messungen identifizierten Interaktionen zu den bisher unbekannten Komplexpартnern NFκB1, HEXIM1, DDX6, BRD4 und NPM1 zu verifizieren, wurden Immunopräzipitationen bzw. Co-Immunopräzipitationen durchgeführt.

Für die Immunopräzipitationen gegen endogenes CCNT1, NFκB1, HEXIM1 und DDX6 wurden 293T-Zellen transient mit den Expressionskonstrukten des AF4 bzw. AF4•MLL transfiziert. Anschließend wurden die Präzipitationen, unter Verwendung der entsprechenden Proteinlysate sowie der spezifischen Antikörper gegen den jeweiligen Interaktionspartner, durchgeführt. Es folgten Western Blot-Analysen der Präzipitate, in welchen der α-AF4-N-Antikörper eingesetzt wurde, um die Anwesenheit des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteins zu überprüfen. Die Ergebnisse der Immunopräzipitationen (siehe Abbildung 3.4 A-C) waren negativ für die 293T-Kontrollproben und bestätigten die Bindung von CCNT1 (α-CyclinT1), NFκB1, HEXIM1 und DDX6 an AF4 bzw. AF4•MLL. CCNT1 als bekannter Interaktionspartner diente hierbei als Positivkontrolle der Methode. Die Betrachtung der Resultate für DDX6 weisen zusätzlich auf eine deutlich stärkere Bindung an AF4 als an AF4•MLL hin. Ein Grund hierfür könnte unter anderem das Fehlen spezifischer Bindungssequenzen bzw. vollständiger Interaktionsdomänen im AF4•MLL-Protein sein.

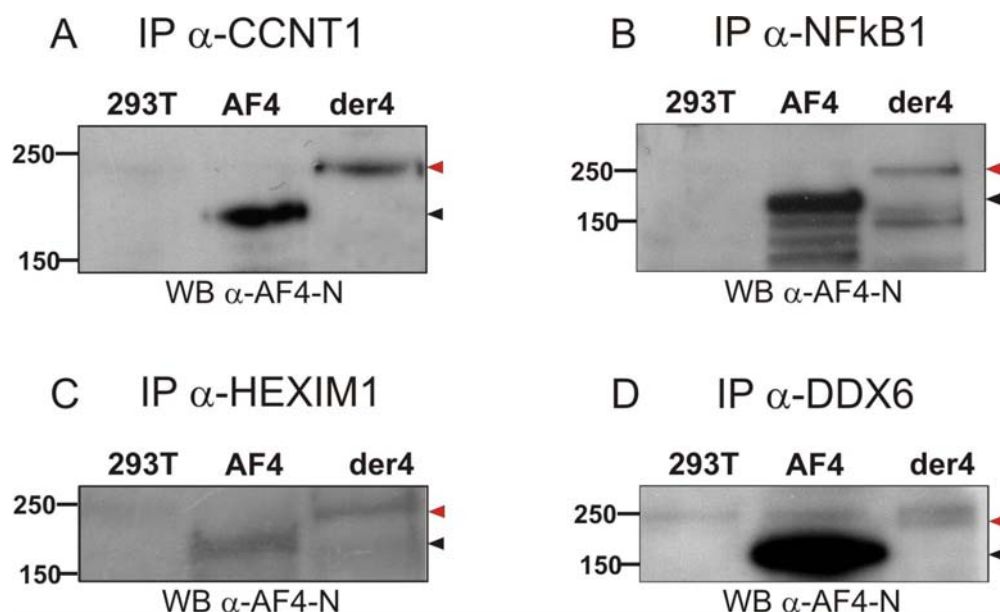


Abb. 3.4

Abb. 3.4: Immunopräzipitationen zur Verifizierung der neuen Komplexparker des AF4- bzw. des AF4•MLL-Proteinkomplexes.

Nach transienter Transfektion von 293T-Zellen mit den Expressionskonstrukten für die Proteine AF4 bzw. AF4•MLL wurden Proteinlysate hergestellt. Die Lysate wurden anschließend in Immunopräzipitationen (IP) des zu verifizierenden Komplexparkers eingesetzt. Die Analyse der Immunopräzipitationen erfolgte über Western Blot (WB).

A/B/C: Western Blot-Analysen der Immunopräzipitationen für **A:** CCNT1, **B:** NFκB1, **C:** für HEXIM1 und **D:** für DDX6. Die Detektion des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteins erfolgte über den α-AF4-N-Antikörper. schwarzer Pfeil: AF4-Protein; roter Pfeil: N-terminales Fragment p178 des AF4•MLL/der4-Proteins; 293T: Negativkontrolle; Proteinstandard an der linken Seite des Western Blots.

Die Untersuchung der Interaktionen des BRD4- bzw. NPM1-Proteins mit dem AF4- bzw. AF4•MLL-Protein erfolgte über Co-Immunopräzipitationen, da hier die Immunopräzipitationen gegen das endogene BRD4- bzw. NPM1-Protein keine eindeutigen Ergebnisse aufwiesen. Zu diesem Zweck wurden zunächst eGFP fusionierte Expressionskonstrukte des NPM1 und Brd4 hergestellt, welche eine spezifische Detektion der Proteine über den α-eGFP-Antikörper sowie eine schnelle Überprüfung der Expression aufgrund der Fluoreszenz der transfizierten Zellen ermöglichen sollten. Im Falle des NPM1 wurde der vollständige Leserahmen verwendet, während für BRD4 der für die P-TEFb-Interaktion verantwortliche Bereich der beiden Bromodomänen ausgewählt wurde (Jang *et al.*, 2005). Die Verwendung eines verkürzten Konstruktes sollte eine Unterscheidung der Signale des BRD4-Proteins von dem in 3.2.1 beschriebenen ähnlichen Bandenmuster des AF4 erleichtern.

Für die Co-Immunopräzipitationen wurden die Expressionsvektoren für BRD4- bzw. NPM1-eGFP entweder alleine oder in Kombination mit den Vektoren des AF4 bzw. AF4•MLL transient transfiziert. Die entsprechenden Proteinlysate wurden anschließend in Co-Immunopräzipitationen mit dem α-BRD4-N17- bzw. α-NPM-Antikörper eingesetzt (siehe Abbildung 3.5 A und B). Western Blot-Analysen der Proteinlysate mittels α-AF4-N-Antikörper bestätigten die Expression des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteins (siehe Abbildung 3.5 A und B unten). Die Untersuchungen der Präzipitate unter Verwendung des α-eGFP-Antikörpers bestätigte die Expression und Präzipitation der jeweiligen eGFP-fusionierten Proteine BRD4-eGFP und NPM1-eGFP (siehe Abbildung 3.5 A und B Mitte).

Die Analyse der NPM1-Präzipitation auf die Bindung des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteins weist ein deutlich positives Signal für AF4 auf und ein schwaches Signal für AF4•MLL auf. Es ist demnach anzunehmen, dass NPM1 in beiden Proteinkomplexen auftritt, wobei jedoch die Bindung an den AF4•MLL-Proteinkomplex weitaus schwächer ist (siehe Abbildung 3.5 B oben). Die Präzipitation mit dem α -BRD4-N17-Antikörper hingegen bestätigt nur die Bindung an AF4, jedoch keine Interaktion zu AF4•MLL (siehe Abbildung 3.5 A oben).

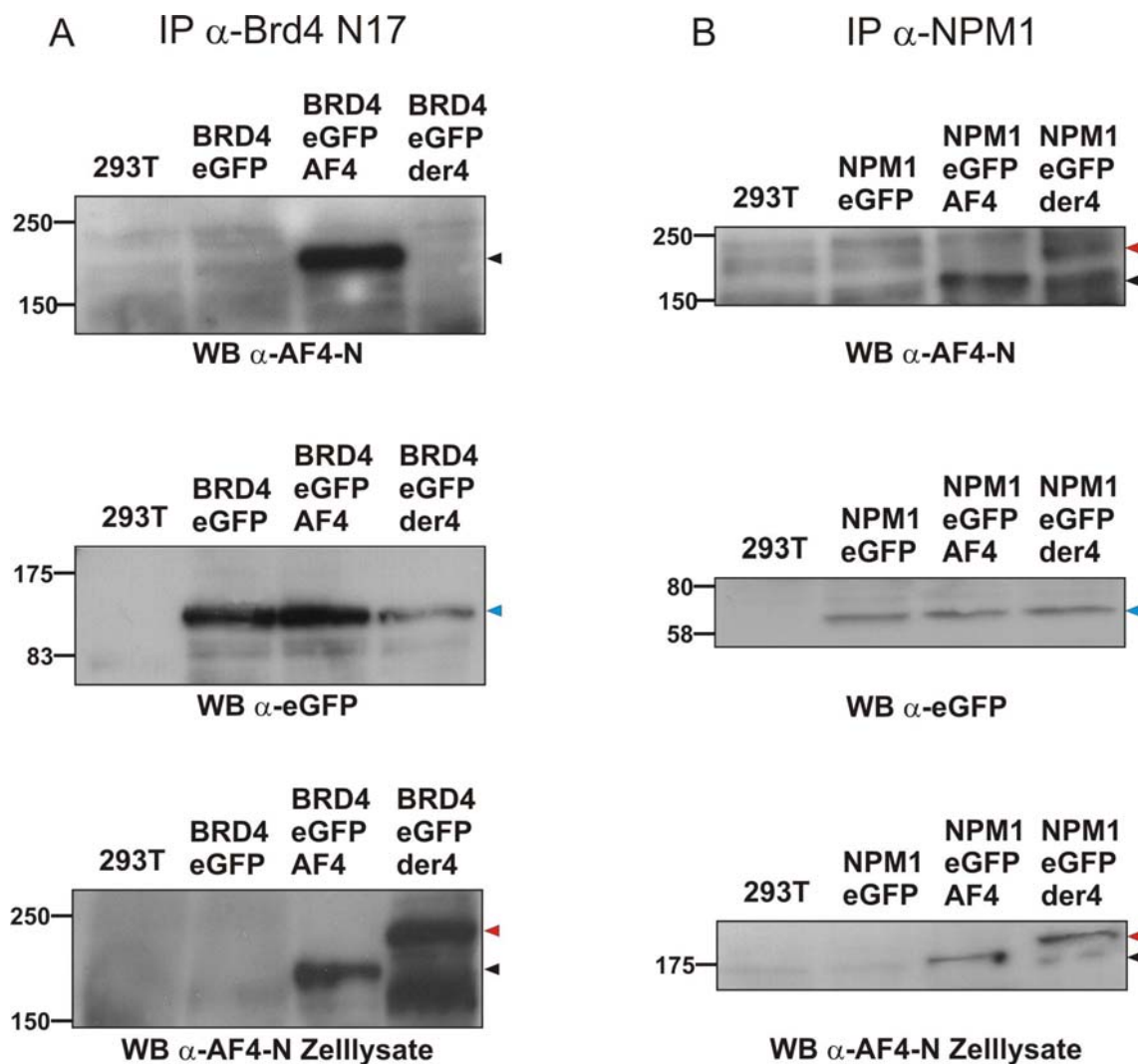


Abb. 3.5

Abb. 3.5: Co-Immunopräzipitationen zur Verifizierung der neuen Komplexparker des AF4- bzw. des AF4•MLL-Proteinkomplexes.

Nach transienter Transfektion von 293T-Zellen mit den Expressionskonstrukten für BRD4-eGFP oder NPM1-eGFP alleine bzw. zusätzlich mit den Konstrukten für die Proteine AF4 bzw. AF4•MLL wurden Proteinlysate hergestellt. Die Lysate wurden anschließend in Co-Immunopräzipitation des zu verifizierenden Komplexparkers eingesetzt. Die Analyse der Co-Immunopräzipitationen (IP) erfolgte über Western Blot (WB).

A/B: Western Blot-Analysen der Co-Immunopräzipitationen für **A:** BRD4-eGFP, **B:** NPM1-eGFP. Die Detektion des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteins erfolgte über den α -AF4-N-Antikörper, die des BRD4-eGFP (ca. 100 kDa) bzw. NPM1-eGFP (ca. 60 kDa) über den α -eGFP-Antikörper. Der α -AF4-N-Western Blot der Zelllysate diente als Expressionskontrolle. schwarzer Pfeil: AF4-Protein; roter Pfeil: N-terminales Fragment p178 des AF4•MLL/der4-Proteins; blaue Pfeile: detektiertes BRD4-eGFP bzw. NPM1-eGFP; 293T: Negativkontrolle; Proteinstandard an der linken Seite des Western Blots.

3.3 Nachweis der Methyltransferaseaktivität des AF4- bzw. AF4•MLL-Proteinkomplexes

Um abschließend eine Aussage über die Funktionalität der gereinigten Proteinkomplexe treffen zu können, wurde ein *in vitro* Histon-Methyltransferase-Assay durchgeführt, in dem die DOT1L-abhängige H3K79-Methylierung durch den AF4-Proteinkomplex bzw. die H3K4-Trimethylierung durch den SET-Domänenkomplex des AF4•MLL-Proteinkomplexes nachgewiesen werden sollte.

Zunächst wurden die beiden Proteinkomplexe über die Strep-Tag-Affinitätschromatographie isoliert. Als Negativkontrolle diente eine Reinigung aus Zellen, welche zuvor mit dem Leervektor (pEXPR-IBA103) transfiziert wurden. Die gereinigten Proteinkomplexe bzw. die Kontrollprobe wurden mit gereinigten Nukleosomen (siehe Abbildung 3.6 B) bzw. einem GST-fusionierten N-terminalen H3-Peptid (Aminosäuren 1-46 des H3 Histons; siehe Abbildung 3.6 C) sowie dem Substrat S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-(methyl-³H) inkubiert. Die erhaltenen Proben wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und das markierte Substrat über Fluorographie detektiert. Zur Auswertung der mit gereinigten Nukleosomen inkubierten Proben diente zusätzlich ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel als Größenreferenz zur Bestimmung der jeweiligen Laufhöhen der Histone (siehe Abbildung 3.6 A).

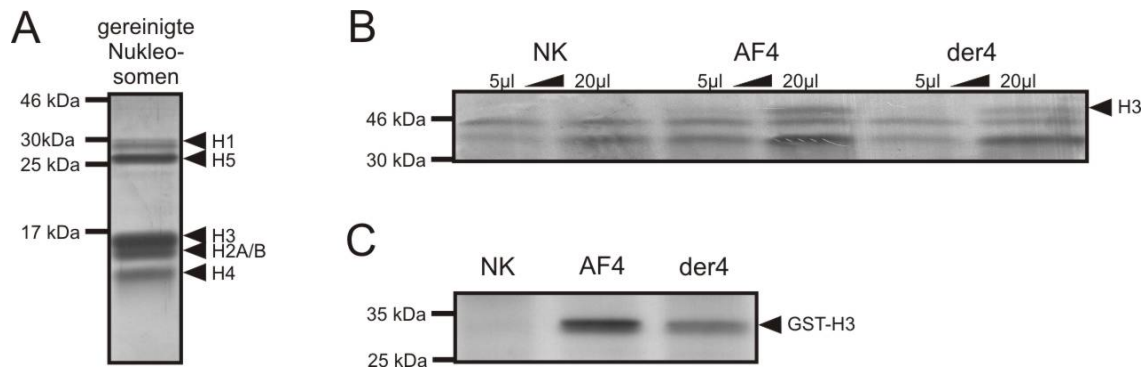


Abb. 3.6: Detektion der Histon-Methylierung durch den AF4- bzw. AF4•MLL-Proteinkomplex.

In vitro Histon-Methyltransferase-Assay zum Nachweis der Histon H3-Methylierung durch den **AF4**-Proteinkomplex bzw. den **AF4•MLL (der4)**-Proteinkomplex. Die gereinigten Proteinkomplexe wurden mit gereinigten Nukleosomen (**B**) bzw. mit einem GST-H3-Peptid (GST-fusionierte N-terminale Aminosäuren 1-46 des H3, ~31 kDa; **C**) sowie dem Substrat S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-(methyl-3H) inkubiert. Nach der Auftrennung der Proben in einem 15 % bzw. 18 % SDS-Gel erfolgte die Detektion mittels Fluorographie.

A 15 % SDS-PAGE der gereinigten Nukleosomen mit anschließender Coomassie-Färbung als Größenreferenz zur Auswertung der Proben in **B**. **B**. 5-20 µl der gereinigten Proteinkomplexe inkubiert mit 15 µg der Core Histone und S-(5'-Adenosyl)-L-methionine-(methyl-3H); 15 % SDS-PAGE. **C**: 15 µl der gereinigten Proteinkomplexe inkubiert mit 3 µg des GST-H3-Peptids und S-(5'-Adenosyl)-L-methionine-(methyl-3H); 18 % SDS-PAGE. **NK**: Negativkontrolle / Reinigung aus Zellen, welche zuvor mit dem Leervektor (pEXPR-IBA103) transfiziert wurden.

Die Ergebnisse des Histon-Methyltransferase-Assays (HMT) unter Verwendung der gereinigten Nukleosomen zeigten für den AF4- und den AF4•MLL-Proteinkomplex ein deutliches Signal der ^3H -markierten Methylierung am Histon H3, wenn eine ausreichende Menge (20 µl) des Proteinkomplexes eingesetzt wurde (siehe Abbildung B, Spur 4 AF4 und 6 der4). In jeder Probe traten zusätzlich unspezifische Signale für H1, H2B und H4 auf, welche auf Kontaminationen mit methylierenden Enzymen zurückzuführen sein könnten. Die Negativkontrolle wies jedoch kein Signal der H3-Methylierung auf (siehe Abbildung B, Spur 1 und 2 NK). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Komposition der Proteinkomplexe ist demnach eine Methylierung des Histon H3 am Lysinrest 79 durch Dot1L im AF4-Proteinkomplex bzw. am Lysinrest 4 durch den SET-Domänenkomplex des AF4•MLL-Proteinkomplexes anzunehmen.

Die parallele Durchführung des HMT mit dem GST-H3-Peptid, welches die ersten 46 Aminosäuren des H3 enthält, lieferte ebenfalls ein positives Ergebnis für die beiden Proteinkomplexe (siehe Abbildung C, Spur 2 AF4 und 3 der4),

während die Negativkontrolle erneut kein Signal zeigt (siehe Abbildung C, Spur 1 NK). Im Bezug auf den AF4•MLL-Proteinkomplex weist dies ebenfalls auf eine H3K4-Methylierung durch den SET-Domänenkomplex hin. Im Falle des AF4-Proteinkomplexes war jedoch in den ersten 46 Aminosäuren des H3 keine Methylierung zu erwarten, da für die ermittelten Komplexpartner lediglich eine H3K79-Methylierung über DOT1L bekannt ist. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass der AF4-Proteinkomplex über eine unbekannte Methyltransferase-Aktivität verfügt, die in der Lage ist eine zusätzliche Aminosäure des Histon H3 zu methylieren.

4 Diskussion

Die Prognose für Patienten mit einer Hochrisiko-Leukämie, welche auf einer chromosomalen Translokation des *MLL*-Gens beruht, ist bis heute sehr schlecht. Der Mechanismus zur Entstehung dieser Leukämien konnte noch nicht ausreichend aufgeklärt werden. Die Gemeinsamkeit der *MLL*-Translokationen liegt jedoch in der Entstehung eines Fusionsproduktes, welches den N-Terminus des MLL beinhaltet. Im Bezug auf die häufigste chromosomale Translokation, die t (4;11)-Translokation, wurde demnach die Hypothese aufgestellt, dass allein das MLL•AF4-Fusionsprotein für die Leukämogenese entscheidend ist (Rowley, 1992). Die Tatsache, dass in 80% der Patienten zusätzlich das reziproke AF4•MLL-Fusionsprotein vorhanden ist und 20% der Patienten über komplexe Veränderungen 2 oder mehr Fusionsallele besitzen (Kowarz *et al.*, 2007), spricht jedoch unter anderem für eine Rolle des AF4•MLL-Fusionsproteins im Mechanismus der Leukämieentstehung.

In diesem Zusammenhang konnte in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Expression des AF4•MLL-Fusionsproteins in der Entwicklung onkogener Effekte und letztendlich in der Wachstumstransformation der Zelle resultiert (Bursen *et al.*, 2004). Dieses onkogene Potenzial des AF4•MLL-Fusionsproteins konnte in einem konditionalen *in vitro* Zellkultur-Modellsystem bestätigt werden (Gaussmann *et al.*, 2007). Des Weiteren war es jedoch auch durch die Überexpression des AF4-Wildtyp-Proteins bzw. des N-Terminus des AF4 möglich Zellen in ihrem Wachstum zu transformieren, wodurch das AF4-Protein sich als strikt kontrolliertes Proto-Onkoprotein herausstellte (Bursen *et al.*, 2004). Ein AF4 *knock-out* Modell in Mäusen wies hingegen einen Wachstumsarrest und eine Beeinträchtigung der Entwicklung der Lymphozyten auf (Isnard *et al.*, 2000).

Ergänzend zu diesen Untersuchungen war es in der vorliegenden Arbeit möglich, eine Methode zur Reinigung der Proteinkomplexe des AF4-Wildtyp- bzw. AF4•MLL-Proteins zu etablieren. Diese Methode ermöglichte die Identifizierung von Komplexpartnern und somit die Erweiterung bzw.

Bestimmung der Komposition der beiden Multiproteinkomplexe. Zusätzlich konnte ein Histon-Methyltransferase-Assay für die beiden Proteinkomplexe durchgeführt werden. Die erhaltenen Ergebnisse erlaubten es letztendlich Rückschlüsse auf potenzielle Funktionen zu ziehen.

4.1 Neue Komplexparker des AF4-Proteinkomplexes und ihre potentielle Funktion

Mit Hilfe einer Affinitätschromatographie, welche auf dem Strep-Tag-System basiert, konnte der AF4-Multiproteinkomplex aus transient transfizierten 293T-Zellen isoliert werden. Die anschließende Verwendung massenspektrometrischer Analysen, Western Blot-Analysen sowie Immunopräzipitationen ermöglichte den Nachweis sowohl bekannter als auch neuer Komponenten des Proteinkomplexes (siehe Abbildung 4.1). Die Identifizierung der Komplexparker des AF4-Multiproteinkomplexes belegte zunächst die Anwesenheit der bekannten Mitglieder ENL, AF10, DOT1L und P-TEFb. (Bitoun *et al.*, 2007; Zeisig *et al.*, 2005). Dies bestätigt die Rolle des AF4-Proteinkomplexes in der Stimulation der RNA Polymerase II abhängigen transkriptionellen Elongation sowie in koordiniertem Chromatin Remodeling über eine DOT1L-abhängige H3K79-Methylierung. Der AF4-Proteinkomplex vermittelt über P-TEFb die Phosphorylierung der RNA Polymerase II und somit deren Umwandlung in die aktive elongierende Form, während DOT1L über die H3K79-Methylierung die Erhaltung der Transkription gewährleistet (Bitoun *et al.*, 2007). Über einen *in vitro* HMT-Assay war es möglich die DOT1L-abhängige H3K79-Methyltransferase-Aktivität des AF4-Proteinkomplexes zu bestätigen. Die Ergebnisse mit einem verkürzten Histon H3-Peptid der ersten 46 Aminosäuren ließen jedoch zusätzlich auf eine bisher unbekannte Methyltransferase-Aktivität des AF4-Proteinkomplexes schließen.

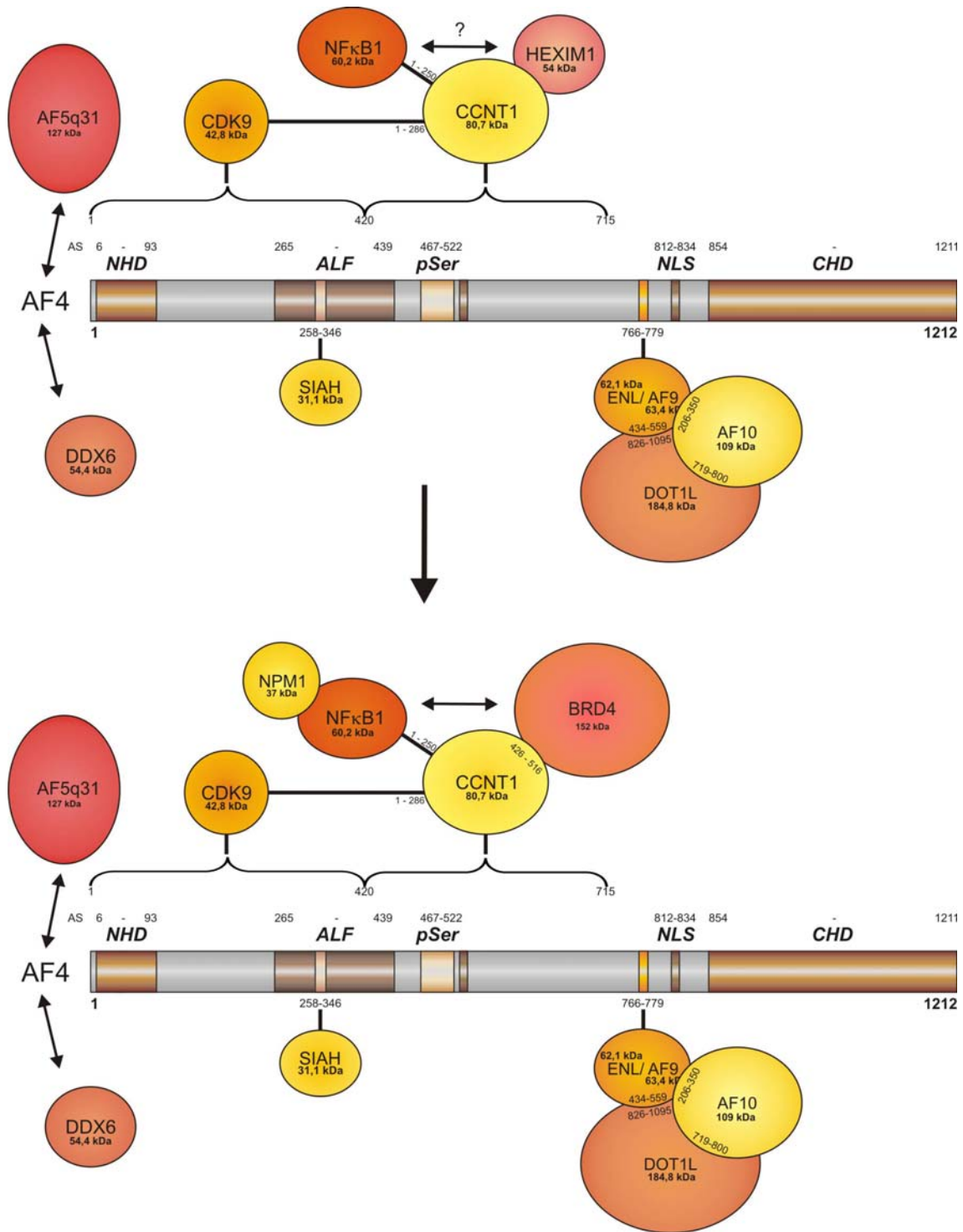


Abb. 4.1: Modell des aktiven / inaktiven Status des AF4-Multiproteinkomplexes unter Einbezug der neuen Komplexpartner.

Die Abbildung zeigt zwei Modelle des AF4-Proteinkomplexes, welche die bisher veröffentlichten mit den neu identifizierten Komplexpartnern kombinieren und einen aktiven sowie inaktiven Status des AF4-Proteinkomplexes beschreiben. Die verwendeten Abkürzungen der AF4-Proteindomänen sind in Abbildung 2.5 erläutert. Zahlen: Aminosäuren im AF4-Protein, an welchen sich die jeweilige Domäne befindet bzw. die entsprechenden Aminosäuren die für eine Proteininteraktion identifiziert wurden; geschweifte Klammer: Bereich der Proteininteraktion, wenn keine genauere Interaktionsdomäne identifiziert wurde.

Neben den schon in früheren Untersuchungen nachgewiesenen Komplexpartnern sowie AF5 als weiteres Mitglied der ALF-Proteinfamilie (Mueller *et al.*, 2007), konnten mit BRD4, HEXIM1, NFκB1, NPM1 und DDX6 ebenso neue Komponenten des AF4-Proteinkomplexes verifiziert werden. Die parallele Identifizierung des HEXIM1 als negativen Regulator des P-TEFb (Michels *et al.*, 2004; Yik *et al.*, 2003) sowie des BRD4 als positiven Regulator (Jang *et al.*, 2005) legt die Vermutung nahe, dass über die verwendeten Methoden zwei verschiedene Stadien des AF4-Proteinkomplexes erfasst wurden. Basierend auf den vorliegenden Daten kann ein Modell erstellt werden, in dem zunächst ein AF4-Proteinkomplex gebildet wird, welcher inaktives an HEXIM1 gebundenes P-TEFb beinhaltet und mit der durch die negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF inhibitierten RNA-Polymerase II assoziiert (siehe Abbildung 4.1 oben). Der Übergang in den aktiven AF4-Proteinkomplex könnte durch den NPM1-vermittelten Abbau des HEXIM1 initiiert werden (Gurumurthy *et al.*, 2008), wobei die Aktivierung des P-TEFb über BRD4 und/oder die Acetylierung des CDK9 durch CREBBP erfolgt (siehe Abbildung 4.1 unten). Das aktivierte P-TEFb phosphoryliert sowohl NELF und DSIF, wodurch NELF abgebaut und DSIF in einen positiven Faktor umgewandelt wird, als auch den Serinrest 2 der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II, welche dadurch in die aktive transkribierende Form übergeht. Als Feedback-Kontrolle werden anschließend AF4, ENL/AF9 und NELF phosphoryliert und somit für den proteasomalen Abbau markiert (Bitoun *et al.*, 2007).

Das BRD4-Protein ist über die Aktivierung des P-TEFb hinaus in der Lage über seine Bromodomänen mit acetyliertem Histon H3 und H4 zu interagieren und somit an aktives Chromatin zu binden (Dey *et al.*, 2003). Durch die Bindung des BRD4 an CCNT1 kann P-TEFb bzw. der AF4-Komplex demnach an Promotoren rekrutiert werden und dort die transkriptionelle Elongation vermitteln (Jang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Eine alternative Möglichkeit den AF4-Proteinkomplex an spezifische Targetgene zu steuern wird durch die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors NFκB1, welcher ebenfalls mit CCNT1 interagieren kann, gewährleistet (Barboric *et al.*, 2001). Es ist demnach anzunehmen, dass der AF4-Proteinkomplex unter anderem die transkriptionelle Elongation sowie die H3K79-Methylierung an Zielgenen des NFκB1 vermittelt

und dass der Komplex möglicherweise durch NFκB1-Signalprozesse beeinflusst wird. Weiterhin ist BRD4 in der Lage an die RelA Untereinheit des NFκB1 zu binden, wenn diese acetyliert vorliegt. Auf diese Weise kann BRD4 als Co-Aktivator des NFκB1 zum Beispiel die Expression verschiedener inflammatorischer Gene verstärken (Huang *et al.*, 2008).

Zusätzlich befindet sich Nukleophosmin/NPM1, welches in der Lage ist mit NFκB1 zu interagieren, im AF4-Proteinkomplex. Die genaue Funktion des NPM1 im AF4-Proteinkomplex ist noch unklar. Es spielt jedoch unter anderem eine Rolle in der Regulation der Promotor-Aktivität des mit Zellwachstum verbundenen Transkriptionsfaktors E2F1. In Abhängigkeit von NPM1 erfolgt die Bindung des NFκB1 an den E2F1-Promotor, wobei NFκB1 als Faktor der Erhaltung bzw. Aktivierung fungiert (Lin *et al.*, 2006). Es besteht demnach die Möglichkeit, dass der AF4-Proteinkomplex über NPM1 und NFκB1 an den E2F1-Promotor rekrutiert wird und Einfluss auf dessen Aktivität hat. Des Weiteren ist die Deregulation des NPM1 in zahlreichen Fällen mit der Entstehung von akuten myeloischen Leukämien verknüpft (Grummit *et al.*, 2008). Die Überexpression des NPM1 resultiert in einer erhöhten Proliferation sowie in einer onkogen-vermittelten Transformation (Grisendi *et al.*, 2006). Zusätzlich führt die Überexpression des NPM1 ebenso zu einem verringerten HEXIM1 Proteinlevel durch den proteasomalen Abbau des HEXIM1 und somit zu erhöhter P-TEFb-abhängiger Transkription. Die Fehlregulation der RNA-Polymerase II abhängigen Transkription könnte demnach in die Entstehung der AML involviert sein (Gurumurthy *et al.*, 2008).

Des Weiteren konnte ebenso die ATP-abhängige RNA-Helikase DDX6 im AF4-Proteinkomplex identifiziert werden. DDX6 wird auch als Proto-Onkogen RCK bezeichnet und interagiert mit Proteinen, welche eine Rolle in der Translationskontrolle und der Prozessierung von mikroRNAs spielen (Chu und Rana, 2006).

Trotz der Identifizierung sowohl der bekannten als auch einiger neuer Komplexpartner des AF4-Proteinkomplexes besteht eine Diskrepanz zwischen der in der Größenausschlusschromatographie ermittelten Komplexgröße und der Größe aus der Addition des Molekulargewichts der einzelnen Mitglieder im Komplex. Es ist demnach anzunehmen, dass noch weitere Proteine an den AF4-Proteinkomplex binden können.

4.2 Die Rolle des AF4•MLL-Proteinkomplexes in transkriptionellen und epigenetischen Prozessen

4.2.1 Der AF4•MLL-Proteinkomplex im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinkomplexen von AF4 bzw. MLL

Die Strep-Tag-Affinitätschromatographie ermöglichte neben der Reinigung und Untersuchung des AF4-Proteinkomplexes ebenso die Isolierung des AF4•MLL-Proteinkomplexes aus transient transfizierten 293T-Zellen sowie die Identifizierung seiner Komponenten. Es konnten sowohl Mitglieder des MLL- als auch des AF4-Wildtyp-Proteinkomplexes verifiziert werden (siehe Abbildung 4.2 und 4.3). Es ist demnach anzunehmen, dass zwischen dem AF4•MLL- und den beiden Wildtyp-Proteinkomplexen eine Konkurrenzsituation besteht, welche von der Häufigkeit des jeweiligen Komplexes in der Zelle abhängt. In diesem Zusammenhang ist es entscheidend, dass die Proteinmenge des AF4-Wildtypproteins in der Zelle strikt über den SIAH-vermittelten proteasomalen Abbau reguliert wird. Das AF4•MLL-Protein hingegen akkumuliert in der Zelle, da es nach der Spaltung durch die Taspase und die anschließende Interaktion der entstandenen Fragmente nicht mehr abgebaut werden kann (Bursen *et al.*, 2004).

Der Vergleich des AF4•MLL- mit dem MLL-Wildtyp-Proteinkomplex (siehe Abbildung 4.2) zeigt zunächst, dass am C-Terminus des AF4•MLL-Proteins die Bindung der Komponenten des SET-Domänenkomplexes bestätigt werden konnte. Die Anwesenheit von ASH2L, RBBP5, WDR5 und DPY-30 spricht für einen funktionellen Komplex, welcher in der Lage ist Histon H3K4-Trimethylierung zu vermitteln (Cho *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2002; Wysocka *et al.*, 2005). Diese Annahme wurde durch den Histon-Methyltransferase-Assay bestärkt. Des Weiteren konnte ebenso die Interaktion von HCF-1 und HCF-2 an den SET-Domänenkomplex bestätigt werden. Aufgrund der Verifizierung von CREBBP als Mitglied des AF4•MLL-Proteinkomplexes ist zusätzlich parallel zum MLL-Proteinkomplex eine Acetyltransferase-Aktivität anzunehmen.

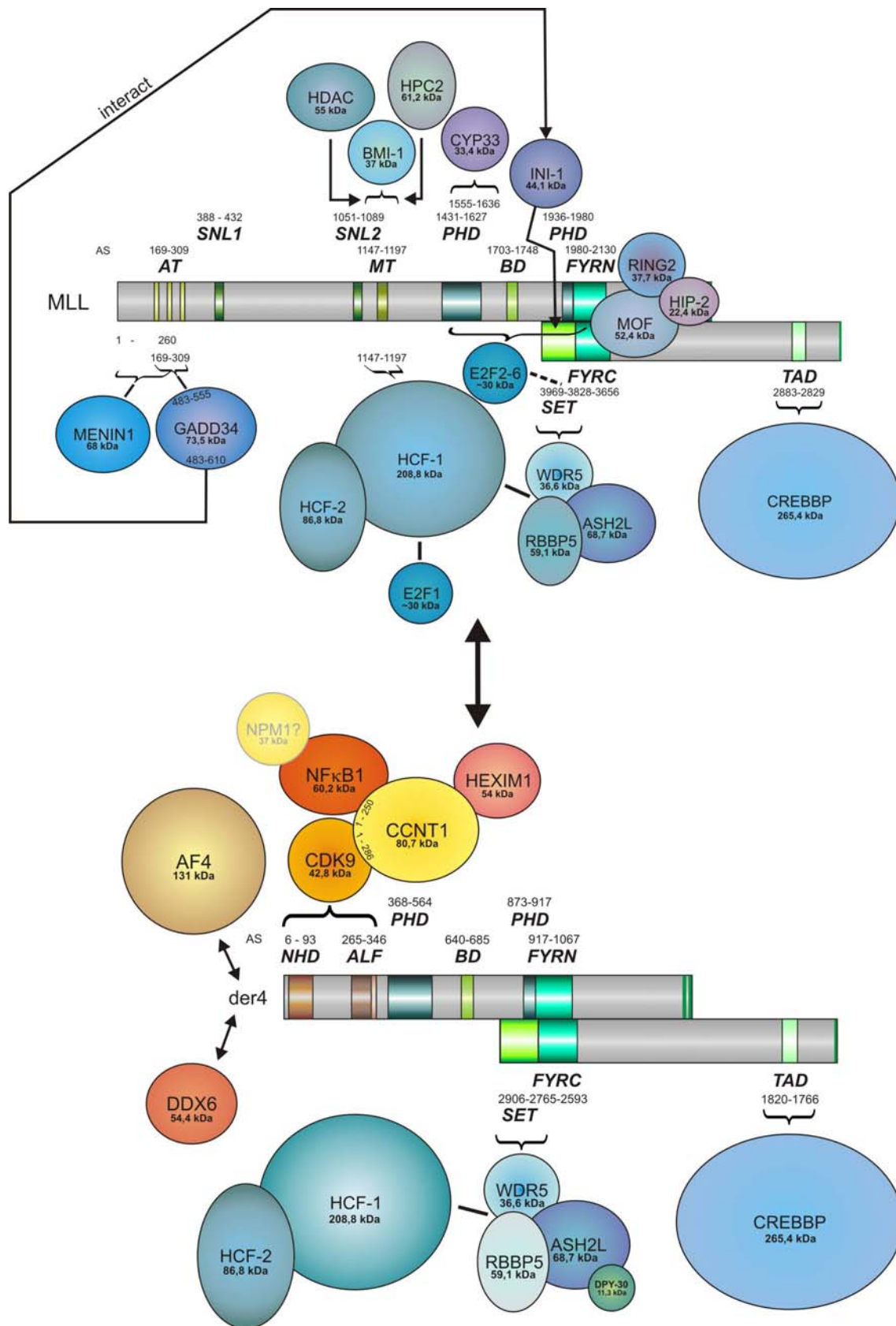


Abb. 4.2

Abb. 4.2: Vergleich des MLL- mit dem AF4•MLL-Multiproteinkomplex

Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen dem MLL-Proteinkomplex und dem Modell des AF4•MLL-Multiproteinkomplexes. Die verwendeten Abkürzungen der MLL- bzw. AF4-Proteindomänen sind in Abbildung 2.3/2.5 erläutert. Zahlen bzw. geschweifte Klammer: Aminosäuren bzw. Bereiche im AF4•MLL-Protein, an welchen sich die jeweilige Domäne befindet bzw. die entsprechenden Aminosäuren die für eine Proteininteraktion identifiziert wurden

Einige MLL-Komplexmitglieder wie MOF, HIP-2, RING2 (Dou *et al.*, 2005), INI-1, GADD34 (Adler *et al.*, 1997 und 1999) und die E2F-Faktoren (Tyagi *et al.*, 2007) konnten jedoch nicht nachgewiesen werden, obwohl ihre Bindedomänen im AF4•MLL-Protein enthalten sind. In Folge dessen kann beispielsweise die Histon H4K16-Acetylierung durch MOF nicht erfolgen. Darüber hinaus können Proteine wie MENIN oder das Polycombprotein BMI-1 nicht an den AF4•MLL-Proteinkomplex binden, da sich ihre Proteinbindedomänen im N-terminalen Bereich des MLL-Proteins befinden. Funktionen des MLL-Proteinkomplexes, welche über diese Komplexpartner ausgeübt werden, können demnach vom AF4•MLL-Proteinkomplex nicht vermittelt werden. Somit kann beispielsweise die spezifische Rekrutierung des Proteinkomplexes an Zielgene von MENIN1 nicht erfolgen (Hughes *et al.*, 2004; Milne *et al.*, 2004), wodurch der AF4•MLL-Proteinkomplex ein unspezifisches, ektopes H3K4-Trimethylierungsmuster verursachen könnte.

Auch die Gegenüberstellung zwischen dem AF4•MLL- und dem AF4-Wildtyp-Proteinkomplex weist Parallelen auf (siehe Abbildung 4.3). Die Identifizierung des P-TEFb im AF4•MLL-Proteinkomplex ermöglicht erneut die Bindung an die RNA-Polymerase II und somit eine kompetitive Situation zwischen den beiden Proteinkomplexen. Im Zusammenhang mit der Aktivität des P-TEFb konnte hingegen im AF4•MLL-Proteinkomplex nur der negative Regulator HEXIM1 und kein BRD4-Aktivator identifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit der Stimulation des P-TEFb könnte somit lediglich durch die p300 abhängige Acetylierung des CDK9 gewährleistet sein (Fu *et al.*, 2007). Die vorliegenden Ergebnisse sprechen jedoch zunächst für einen inaktiven Status des P-TEFb, da keine Aussage über die CDK9-Acetylierung getroffen werden kann. Eine reprimierende Eigenschaft des AF4•MLL-Proteinkomplex ist dennoch nicht anzunehmen, da der N-CoR-Komplex nicht nachgewiesen werden konnte.

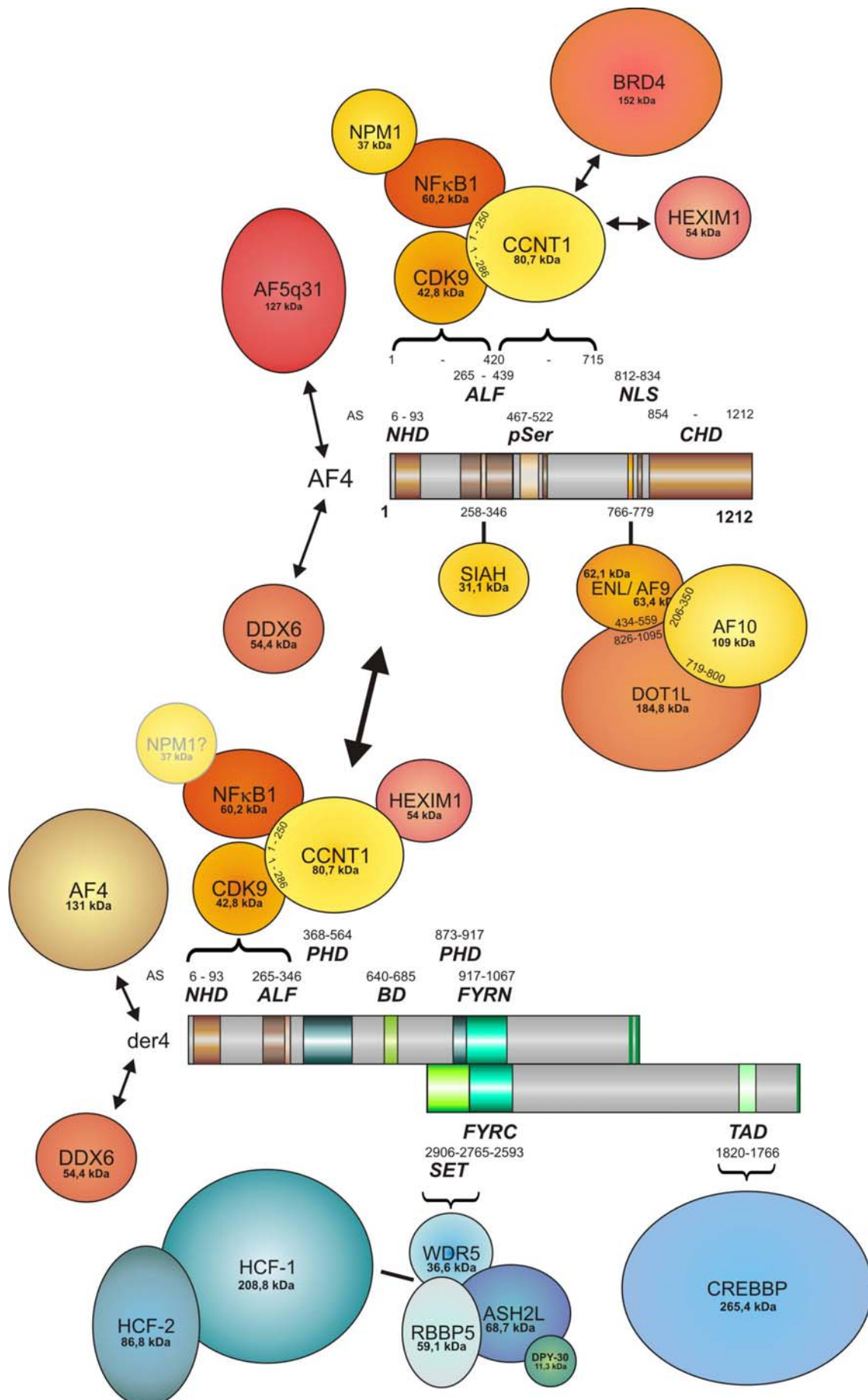


Abb. 4.3

Abb. 4.3: Vergleich des AF4- mit dem AF4•MLL-Multiproteinkomplex

Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen dem Modell des AF4-Proteinkomplexes und dem Modell des AF4•MLL-Multiproteinkomplexes. Die verwendeten Abkürzungen der MLL- bzw. AF4-Proteindomänen sind in Abbildung 2.3/2.5 erläutert. Zahlen bzw. geschweifte Klammer: Aminosäuren bzw. Bereiche im AF4•MLL-Protein, an welchen sich die jeweilige Domäne befindet bzw. die entsprechenden Aminosäuren die für eine Proteininteraktion identifiziert wurden

Neben P-TEFb konnten ebenso NFκB1 und NPM1 als Komponenten des AF4•MLL-Proteinkomplex bestätigt werden. Die Bindung des NPM1 an den AF4•MLL-Proteinkomplex erwies sich als deutlich schwächer im Gegensatz zum AF4-Proteinkomplex, so dass vermutlich weniger bis kein NPM1-vermittelter Abbau des HEXIM1 stattfinden kann. Dies steht im Einklang mit der Anwesenheit des HEXIM1 und der Abwesenheit des BRD4 im AF4•MLL-Proteinkomplex. Aufgrund der Bindung des Transkriptionsfaktors NFκB1 besteht die Möglichkeit, dass der AF4•MLL-Proteinkomplex wie der AF4-Proteinkomplex unter anderem an spezifische Targetgene des NFκB1 rekrutiert werden kann. Dies würde in der Verknüpfung der über den MLL-C-Terminus vermittelten H3K4-Trimethylierungsaktivität mit Targetgenen des NFκB1 und somit in ektopen Histonmodifikationen bzw. epigenetischen Abweichungen resultieren.

Zusätzlich zum Nachweis der Komponenten des MLL- bzw. AF4-Wildtyp-Proteinkomplexes zeigten die massenspektrometrischen Untersuchungen mit 23 identifizierten C-terminalen AF4-Peptiden eine deutliche Interaktion zwischen dem AF4•MLL- und dem AF4-Wildtyp-Protein. Die Interaktion beruht auf den beiden N-Termini der Proteine, da FelC, das verkürzte N-terminale Produkt des *AF4*-Gens, in weiterführenden Experimenten ebenfalls mit dem AF4•MLL-Protein interagiert (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Trotz der Anwesenheit des AF4-Proteins im AF4•MLL-Proteinkomplex konnte keine Bindung zu ENL/AF9, AF10 und DOT1L festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass das AF4-Protein im AF4•MLL-Proteinkomplex für seine spezifischen Proteininteraktionen nur schwer bis gar nicht zugänglich ist. Die Interaktion zu DDX6 und NPM1 war zusätzlich schwächer als im AF4-Wildtypkomplex, so dass es fraglich bleibt, ob diese beiden Komplexpartner lediglich über die Anwesenheit des AF4-Proteins im AF4•MLL-Proteinkomplex erfasst wurden.

Parallel zu den Ergebnissen des AF4-Proteinkomplexes besteht auch im Falle des AF4•MLL-Proteinkomplex eine Differenz zwischen der ermittelten Komplexgröße und der Addition der Molekulargewichte, so dass hier ebenso weitere Komplexpartner vermutet werden können.

4.2.2 Diskussion der Rolle des AF4•MLL-Proteinkomplexes im pathomolekularen Mechanismus zur Entstehung der t(4;11) Leukämie

Die Prognose für Patienten mit einer t(4;11) Leukämie ist bis heute sehr schlecht, da sie sich im Vergleich zu anderen Formen der AML und ALL als besonders schwer therapierbar herausgestellt hat. Die Aufklärung des pathomolekularen Mechanismus dieser Hochrisiko-Leukämie ist demnach von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass das MLL•AF4/der11 allein für die Leukämogenese verantwortlich ist (Rowley, 1992). Dies steht jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen, welche zeigten, dass für MLL•AF4 in *Soft Agar* und *Focus Formation Assays* kein transformierendes Potential nachgewiesen werden kann sowie dass eine Immortalisierung von Knochenmarkszellen durch MLL•AF4 nicht möglich war (Bangerter, 2001; Bursen *et al.*, 2004; Lavau, 2004). Des Weiteren wird in 80% der Patienten zusätzlich zum MLL•AF4 das reziproke Fusionsprodukt AF4•MLL nachgewiesen, während die anderen 20% komplexe genetische Veränderungen tragen, die jedoch ebenfalls zur Bildung eines reziproken MLL-Allels führen (Kowarz *et al.*, 2007). Diese Tatsachen sprechen dafür, dass das AF4•MLL-Fusionsprodukt ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Leukämogenese spielt.

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Aufklärung der Funktion des AF4•MLL-Proteins belegten dessen onkogenes Potenzial, welches auf der Akkumulation des AF4•MLL Fusionsproteins beruht und letztendlich in der Wachstumstransformation der Zelle resultiert (Bursen *et al.*, 2004; Gaussmann *et al.*, 2006). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Reinigung des AF4•MLL-Proteinkomplexes sowie die Identifizierung der Komponenten des Proteinkomplexes sollten nun helfen die molekulare Ursache dieser onkogenen Effekte bzw. der folgenden Wachstumstransformation genauer zu verstehen.

Die Bestimmung der Zusammensetzung des AF4•MLL-Proteinkomplexes ergab zahlreiche Übereinstimmungen mit den Wildtyp-Proteinkomplexen des MLL- bzw. AF4-Proteins. Aufgrund der Anwesenheit der Proteine aus den Wildtyp-Proteinkomplexen wird die Theorie bestärkt, dass zwischen dem AF4•MLL-Proteinkomplex und den Wildtyp-Proteinkomplexen in der Zelle eine kompetitive Situation um spezifische Faktoren besteht. Dies könnte dazu führen, dass die Assemblierung eines vollständigen und funktionellen MLL- bzw. AF4-Proteinkomplexes nicht mehr möglich ist. In diesem Kontext spielt die Häufigkeit des jeweiligen Komplexes in der Zelle eine ausschlaggebende Rolle. Es ist demnach entscheidend, dass das AF4•MLL-Protein, nach der Spaltung durch die Taspase und die anschließende Interaktion der entstandenen Fragmente, nicht mehr dem SIAH-vermittelten proteasomalen Abbau zugeführt wird und somit in der Zelle akkumuliert (Bursen *et al.*, 2004).

Die erhaltenen Ergebnisse sprechen weiterhin dafür, dass ein Aspekt der Ereignisse, welche zur Transformation der Zelle beitragen, in ektopen Mustern von Histonmodifikationen und somit in der Reorganisation des Chromatins liegt. Im Bezug auf Histonmodifikationen sind im MLL-Wildtyp-Proteinkomplex unter anderem Zielgene des MENIN1 (Milne *et al.*, 2004) mit der über den SET-Domänenkomplex vermittelten H3K4-Trimethylierung verbunden (Nagy *et al.*, 2002; Wysocka *et al.*, 2005); für den AF4-Proteinkomplex ist hingegen eine Verknüpfung der DOT1L-abhängigen H3K79-Methylierung mit anderen Targetgenen wie die des NFκB1 wahrscheinlich. Im Falle des AF4•MLL-Proteinkomplex kann nun der SET-Domänenkomplex mit seiner H3K4-Trimethylierungsaktivität nicht mehr an Targetgene des MENIN1 rekrutiert werden; demnach können unspezifische H3K4-Trimethylierungsmuster und somit die Aktivierung abweichender Targetgene, verursacht durch den AF4•MLL-Proteinkomplex, angenommen werden. Des Weiteren ist über die Anwesenheit des NFκB1 zusätzlich eine H3K4-Trimethylierungsaktivität an NFκB1-Zielgenen denkbar. Diese Veränderungen der Histonmodifikationen führen somit vermutlich zur Etablierung von ektopen Expressionsmustern, so dass die reguläre Entwicklung der Zelle beeinträchtigt bzw. verändert wird. In einem *in vitro* Zellkulturmodellssystem unserer Arbeitsgruppe konnten in diesem Zusammenhang nach mehrtägiger Expression des AF4•MLL-Proteins bereits

deutliche Veränderungen der Transkription von 660 Zielgenen bestätigt werden, wobei über 500 Gene aktiviert wurden (Gaussmann *et al.*, 2007). Parallel zur Theorie der ektopten Genexpression durch AF4•MLL-vermittelte Histonmodifikationen, konnten Krivtsov *et al.* für das MLL•AF4-Protein ähnliche Eigenschaften bereits bestätigen. Diese Daten zeigten, dass die ektope H3K79-Methylierung für eine durch MLL•AF4 vermittelte murine bzw. humane ALL ein charakteristisches Merkmal darstellt sowie für die Aufrechterhaltung der MLL•AF4 abhängigen Genexpression entscheidend ist (Krivtsov *et al.*).

Neben den Abweichungen der Histonmodifikationen weist der Vergleich des AF4- mit dem AF4•MLL-Proteinkomplex weitere entscheidende Unterschiede zwischen den beiden Proteinkomplexen auf, welche zusätzlich einen Beitrag zur AF4•MLL-vermittelten Wachstumstransformation leisten können. Im Falle des AF4-Proteinkomplexes wird wahrscheinlich das zunächst inaktive P-TEFb über den NPM-abhängigen HEXIM1-Abbau in aktives an BRD4 gebundenes P-TEFb umgewandelt und somit die RNA-Polymerase II abhängige transkriptionelle Elongation vermittelt (Bitoun *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2005; Gurusurthy *et al.*, 2008). Dieser Prozess unterliegt einem *Feedback*-Mechanismus, in dem über P-TEFb die Proteine AF4, AF9/ENL und NELF phosphoryliert und somit dem proteasomalen Abbau zugeführt werden; auf diese Weise wird ein stetiger Übergang zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand gewährleistet. Der AF4•MLL-Proteinkomplex hingegen liegt lediglich HEXIM1 gebunden vor. Zusätzlich akkumuliert das AF4•MLL-Protein in der Zelle, da es nach der Hydrolyse durch die Taspase sowie der anschließenden Interaktion der beiden Proteinfragmente stabilisiert und nicht mehr dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Bursen *et al.*, 2004). Demnach könnte das HEXIM1-Protein im Proteinkomplex gebunden bleiben, so dass es der Zelle in verringertem Maße zur Verfügung steht. Ein verringerter HEXIM1-Level in der Zelle hätte eine Erhöhung an aktivem P-TEFb zur Folge, die wiederum in einer gesteigerten Aktivität der RNA-Polymerase II abhängigen Transkription resultieren würde. Dieser Mechanismus könnte parallel zu den auftretenden Veränderungen der Histonmodifikationen ebenfalls über die Deregulation der Genexpression eine Rolle in der Wachstumstransformation bzw. der Leukämogenese spielen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien, Geräte und ihr Bezugsquellen

SUBSTANZEN	BEZUGSQUELLE
ACN (Acetonitril)	Roth
Acrylamid	Roth
Agar	Sigma
Agarose	Invitrogen
6-Aminocapronsäure	Roth
Ammoniumhydrogensulfat	Fluka
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Roth
APOD	Roth
Avidin	IBA GmbH
Biotin	Sigma
Bisacrylamid	Roth
Brillantblau R-250	Sigma
Brillantblau G-250	Sigma
Brom-Phenol-Blau	Roth
BSA	Roth
CaCl ₂	Merck
CAPS	Sigma
Desthiobiotin	IBA GmbH
dNTPs	Peqlab
DTT	Biomol
EDTA	Roth
Entwickler/ Roentogen liquid	Tetenal
Essigsäure	Riedel De Haen
Ethanol	Roth

Ethidiumbromid	Sigma
FA (Ameisensäure)	Sigma
Fixierer/ Roentogen Superfix	Tetenal
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
10x HABA-Lösung	IBA GmbH
Harnstoff	Roth
H₃BO₃	Merck
HEPES	Roth
IAA (Iodacetamid)	Fluka
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Roth
Lysozym	Sigma
MgCl₂	Merck
MgSO₄	Roth
NaAc	Merck
NaCl	Roth
NaF	Riedel-de Haen
NaH₂PO₄	Merck
Na₃VO₄	Sigma
Phosphorsäure	Riedel De Haen
PMSF	Boehringer Mannheim GmbH
RNase	Sigma
Saccharose	Roth
SDS	Biomol
TCA (Trichloressigsäure)	Roth
TEMED (N, N, N', N',-Tetramethylethylen-diamin)	Fluka
TFA (Triflouressigsäure)	Sigma
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma

Trockenmilch (non-fat)	USA (TOPS)
Trypsin Sequencing Grade	Sigma
Tween20	Roth
Xylen-Cyanol-FF	Merck
Yeast Extract	Oxoid
λ -DNA (für DNA-Marker)	MBI Fermentas

ENZYME

alkalische Phosphatase	New England Biolabs
Polymerasen (+ Puffer)	Promega
Restriktionsendonukleasen (- Puffer)	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase (+ Puffer)	New England Biolabs
T4-DNA-QuickLigase (+ Puffer)	New England Biolabs
T4-Polynukleotid-Kinase (+ Puffer)	New England Biolabs

BEZUGSQUELLE

NÄHRMEDIEN/ZUSATZSTOFFE

β -Mercaptoethanol (100 mM)	Invitrogen
DMEM	PAA
Foetal Bovine Serum Gold (FBS)	PAA
L-Glutamin 200 mM	PAA
MG 132	Calbiochem
PBS	PAA
PEI (Polyethylenimin)	Sigma
Penicillin/Streptomycin	PAA
Trypan Blue Stain	Sigma
Trypsin/ EDTA solution 10x	Biochrom AG

BEZUGSQUELLE

GERÄTE

Abi Prism 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems
Accu-Jet	Braun

BEZUGSQUELLE

Agarosegel-Elektrophoresekammer	Owl Separation Systems
"Äkta FPLC"-Fraktionator	GE Healthcare
DNA/RNA Messgerät Gene Quant 1300	GE Healthcare
ELISA Reader MR 5000	Dynatech
Maxigelapparatur	Biometra®
Mikroskop	Nikon
Minigelapparatur	Biometra®
Netzgerät/PS500XT DC Power Supply	Hoefer Scientific Instruments
Neubauer Zählkammer	Mareinfeld
PCR-Geräte	PE Applied Biosystems
pH-Meter	Inolab
Rotationsschüttler/ KS250 basic	KIKA Labortechnik
Rotator	Stuart
Scheidetrichter	Schott
SterilGard Hood (LaminAir HB2427)	Hereaus
"Superose 6 10/300 GL column"	GE Healthcare
Thermoschüttler	Eppendorf
Tischzentrifuge 5414C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5702	Eppendorf
UV-Schirm (TFX-20M)	Life Technologies
Vortex-2 Genie	Scientific Industries
Wasserbäder	Julabo
Zell-Kulturinkubatoren	Heraeus
Tischzentrifuge 5414C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5702	Eppendorf
"UNICORN Version 3.21.02" software	GE Healthcare
Vivaspin500	Vivaspin
Zentrifuge J2-HS	Beckmann
Zentrifuge J6-HC	Beckmann

SONSTIGES MATERIAL	BEZUGSQUELLE
3MM Chromatographiepapier	Whatman
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
Cellstar Gewebekulturschalen (Ø15 cm)	Greiner bio-one
500 cm ² Square Cell Culture Dish (Zellplatte)	Corning Incorporated
Centrivac	Heraeus
Chromatographiesäulchen	BioRad
Core histones (chicken)	Upstate
ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare
Enhancerlösung En ³ hance	Perkin Elmer
Flag-Beads	Sigma
Flag-Peptid	Sigma
Gel Filtration HMW Calibration Kit	GE Healthcare
Mikrozentrifugengefäße/ Caps	Eppendorf
Qiagen Gel Extraction Kit	Quiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Quiagen
Röntgenfilme Fujifilm	Fujifilm
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas
PCR-Gefäße	Greiner bio-one
Polypropylene Säulen (5 ml)	Quiagen
Precision Plus Protein Kaleidoscope	BioRad
Prestained Protein Marker Broad Range	New England Biolabs
Protease Cocktail Set	Calbiochem
Protein-G-Sepharose 4 Fast Flow	Sigma
PVDF Membran	GE Healthcare
Pure Yield Plasmid Purification System	Promega
S-Adenosyl-L-Methionine, S-[methyl-3H]-, Specific Activity: 55-85Ci (2.03-3.15TBq)/mMole, 250µCi (9.25MBq)	Perkin Elmer
Sequenziergefäße	PE Applied Biosystems

Sterile Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner bio-one
Sterile Pipettenspitzen (1000, 200, 20 µl)	Greiner bio-one
Sequenziergefäße	PE Applied Biosystems
Strep-Tactin Säulen	IBA GmbH
96-well Platten	Greiner

5.1.2 Pufferlösungen und Medien

PUFFER	ZUSAMMENSETZUNG	
Anoden-Puffer I pH 10,4	300 mM 20 %	Tris Methanol
Anodenpuffer II pH 10,4	25 mM 20 %	Tris Methanol
10x Bindepuffer	0,2 M	NaH ₂ PO ₄ pH7,0
CaCl₂-Transformationspuffer	10 mM 10 mM 10 mM	Tris CaCl ₂ MgCl
CAPS-Puffer	10 mM 0,1 % 0,01 %	CAPS pH 11 Methanol SDS
DNA-Ladepuffer	50 % 100 mM 0,1 % 0,1 %	Saccharose EDTA Brom-Phenol-Blau Xylen-Cyanol-FF
DTT-Lösung	6 mg 25 mM	DTT NH ₄ HCO ₃
E-Gel-Puffer (pH 7.9)	40 mM 2mM 0.5 mM	Tris EDTA NaAc
Elektrodenpuffer	3,03 g 14,4 g 1,0 g ad 1000 ml	Tris Glycin SDS Wasser
Elutionspuffer	0,1 M	Glycin pH2,5
Elutionspuffer 1 (2 mM Biotin) pH 8,0	100 mM 150 mM 1 mM 2 mM	Tris/ HCl NaCl EDTA Biotin
Elutionspuffer 2 (Desthiobiotin) pH 8,0	100 mM 150 mM 1 mM 5 mM	Tris/ HCl NaCl EDTA Desthiobiotin

Elutionspuffer 3 (10 mM Biotin) pH 8,0	100 mM 150 mM 1 mM 10 mM	Tris/ HCl NaCl EDTA Biotin
Entfärbelösung	100 ml 100 ml ad 1000 ml	Essigsäure Methanol Wassser
Färbelösung	0,8 g 100 ml 40 m ad 500 ml	Brillantblau R-250 Isopropanol Essigsäure Wasser
Fixierlösung	12 g ad 100 ml	TCA Wasser
Fixierlösung (Methyltransferase- Assay)	10 % 10 %	Essigsäure Glycerol
Flag-Elutionspuffer	200 µg/ ml	Flag-Peptid in TBS-Puffer
IAA-Lösung	20 mg 25 mM	IAA NH ₄ HCO ₃
Kathodenpuffer pH 9,4	25 mM 40 mM 20 %	Tris 6-Aminocapronsäure Methanol
2x-Lämmli-Puffer	100 mM 200 mM 4 % 20 % 0,2 %	Tris/ HCl pH 6.8 DTT SDS Glycerol Bromphenolblau
lowTE	10 mM 0,1 mM	Tris/HCl (pH 8,0) EDTA
Lysispuffer pH 7,5	150 mM 20 mM 1% 0,4 mM	NaCl HEPES TritonX-100 EDTA
frisch zugegeben:	1 mM 10 mM 1 mM	Na ₃ VO ₄ NaF PMSF Protease Inhibitor cocktail Set V, EDTA free (100x Stock solution, Calbiochem)
Neutralisationspuffer	1M	Tris/HCl pH9
Neutralisierungslösung	6 g ad 500 ml	Tris Wasser mit H ₃ PO ₄ auf pH 6,5 einstellen

Probenpuffer	10 mg 25 mM	Harnstoff NH ₄ HCO ₃
Regenerierungspuffer (HABA-Puffer) pH 8,0	100 mM 150 mM 1 mM 1 mM	Tris/ HCl NaCl EDTA HABA(Hydroxy-azophenyl-benzoesäure)
Sammelgelpuffer pH 6,8	1 M	Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen
10 % ige SDS-Lösung	10 g	SDS auf 100 ml H ₂ O
Stabilisierungslösung	20 % ad 500 ml	Ammoniumsulfat Wasser
Stammlösung I	3-4 g 250 ml 75 g 100 ml 200 ml	Brillantblau G-250 7,5 %ige Essigsäure Ammoniumsulfat Methanol Aceton
Stammlösung II	100 g 20 gl ad 800 ml	Ammoniumsulfat konzentrierte Phosphorsäure Wasser
ST-Puffer	80 % 5 % 50 mM 50 mM	Saccharose Triton X100 EDTA Tris/HCl (pH8,0)
TBE-Puffer	100 mM 500 mM 2,5 mM	Tris H ₃ BO ₃ EDTA
TBS-Puffer	50 mM 150 mM	Tris NaCl mit HCl auf pH 7,4 einstellen
Trenngelpuffer pH 8,8	1 M	Tris mit HCL auf pH 8,8 einstellen
Waschlösung	25 % ad 500 ml	Methanol Wasser
Waschpuffer pH 8,0	100 mM 150 mM 1 mM	Tris/ HCl NaCl EDTA
Wasch-Puffer (Flag-Tag)	50 mM 150 mM 0,2 %	Tris NaCl TritonX-100 mit HCl auf pH 7,4 einstellen

<i>E.coli</i>-MEDIEN	ZUSAMMENSETZUNG	
Salzlösung (E-Transformation)	1 M 100 mM 100 mM	NaCl MgCl ₂ MgSO ₄
SOB-Medium	2 % (w/v) 0.5 % (w/v)	Bacto-Tryptone Yeast Extract
YT-Medium	1 % 0,5 % 0,5 %	Bacto Tryptone Yeast Extract NaCl
YT-Agar	1.2 %	Agar
YT_{amp}-Medium	100 µg/ml	Ampicillin
YT_{kan}-Medium	25 µg/ml	Kanamycin

5.1.3 Verwendete Organismen

BAKTERIENSTAMM	GENOTYP
TOP10	<i>mcrA</i> , <i>D(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> , <i>F80DlacZDM15</i> , <i>DlacX74</i> , <i>deoR</i> <i>recA1</i> , <i>AraD139</i> , <i>D(ara,leu)</i> , 7697, <i>ga/U</i> , <i>ga/K</i> , <i>l-</i> , <i>rspL</i> , (<i>strepR</i>), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>
SCS110	<i>rpsL</i> (<i>Strr</i>) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZ M15]</i>
ZELLINIE	ZELLTYP/MEDIUM
HEK-293T(ATCC CRL11268)	humane Nierenkarzinom-Zelllinie; abgeleitet von 293 Zellen, in die über den Adenovirus Typ 5 ein temperatursensitives Gen des SV40-T-Antigens inseriert wurde Medium: DMEM

Die Kultivierung der Säugerzellen (293T) erfolgte bei 5 % CO₂, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37°C. Das Medium (DMEM) wurde mit 10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin sowie 2 mM L-Glutamin supplementiert.

5.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Die für Klonierungen, PCR-Analysen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide, wurden von den Firmen Biospring und Operon synthetisiert.

Oligonukleotide für Klonierungen:

PRIMER	SEQUENZ
<i>der4 in IBA103/105</i>	
Sfi/Cla-LinkerFW	5'-CGGAATTCGGCCTCACTGGCCAAGCTTATCGATGGATCCCG-3'
Sfi/Cla-LinkerRW	5'-CGGGATCCATCGATAAGCTTGGCCAGTGAGGCCGAATTCCG-3'
der4-Sbf1 FW	5'-CAACCTGCAGGGCAAGTCGCTGTTCTTCCGGAAGT-3'
der4-Cla1 RW	5'-CCATCGATGTTTAGGAACTTCGGCATTCTTG-3'
SacII/SfiI-Linker FW	5'-GGCCGCGGTCCCATTTCGGCCTCACTGGCCGG-3'
SacII/SfiI-Linker RW	5'-CCGGCCAGTGAGGCCGAATGGGACCGCGGCC-3'
<i>der11 in IBA103/105</i>	
Sfi/Hpa-Linker FW	5'-GGAATTCGGCCTCACTGGCCAAGCTTGTTAACGGATCCCG-3'
Sfi/Hpa-Linker RW	5'-CGGGATCCGTTAACAAGCTTGGCCAGTGAGGCCGAATTCCG-3'
der11-AleI-FW	5'-CCGCACAAATGTGTGCACCTTGCCCT-3'
der11-HpaI-RW	5'-CCGGTTAACAGGTGTTTGGTTAATTCTTGTAGC-3'
HSP70b-FW	5'-CGTCGCGAGCCCGTGCTCGCCTCAGGGA-3'
HSP70b-RW	5'-CGGGCCAGTGAGGCCAAGCTTCTTGTCGGATGC-3'
<i>zusätzl. Flag-Tag in IBA-103</i>	
Flag-MLL.3	5'-TGGCCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGCCTCAC-3'
Flag-MLL.5	5'-AGGCCCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCATGGCCAGTG-3'

Flag-XbaI-Acc65I.3	5'-GGTCTAGAATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGTACCGG- ~
Flag-XbaI-Acc65I.5	5'-GGGGTACCCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCATTCTAGAGG-3'

pTEFb in pTARGET

CDK9.32	5'-CGGATATCATGGCAAAGCAGTACGACTCG-3'
CDK9.52	5'-CGGATATCTCAGAAGACGCGCTCAAAC-3'
CyclinT1.32	5'-CGGATATCATGGAGGGAGAGAGGAAGAAC-3'
CyclinT1.52	5'-CGGATATCTTACTTAGGAAGGGGTGGAAGTG-3'

NPM in pT-eGFP

NPM-XhoI-3	5'-CCGCTCGAGATGGAAGATTCGATGGACATGGAC-3'
NPM-Acc65I-5	5'-CGGGGTACCAGAGACTTCCTCCACTGCCAGAG-3'

Die Oligonukleotide für die Klonierung der Brd4-Konstrukte sind in dieser Tabelle nicht enthalten, da diese Vektoren freundlicher Weise von Jennifer Merkens kloniert und zur Verfügung gestellt wurden.

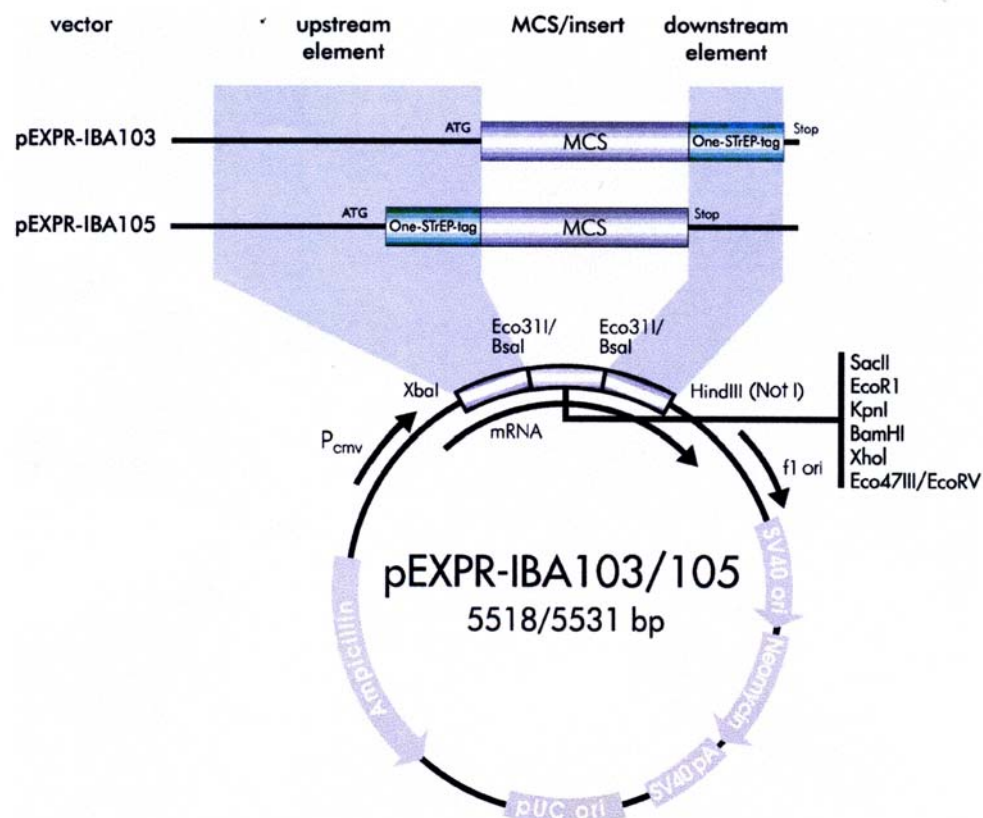
Oligonukleotide für Sequenzierungen:

PRIMER	SEQUENZ
pTarget.32	5'-GCGATTAAGTTGAGTTACGC-3'
pTarget.52	5'-GGAATTGTGAGCGGATAACA-3'
pTarget Cla.5	5'-CGCCGCGCTTAATGCGCCGC-3'
CDK9.31	5'-CAGATCACCCAGCAGTCCACC-3'
CDK9.51	5'-GAACAGCTCCCCGAAGGTGCC-3'
CyclinT1.31	5'-GGAATCTCCTCGAGATCTGGC-3'

CyclinT1.33	5'-GCACAGACTTCTTACTTCATGG-3'
CyclinT1.34	5'-CCTACTCAGGGTCATCGGACTAGT-3'
CyclinT1.51	5'-GTCCACGCCAAAACGACGGGA-3'
IBAder11-FW	5'-CAGTATCTGCTCCCTGCTTGTG-3
IBAder11-RW	5'-GGTGGTCCCGGGTCGGGCGGGGAAG-3
IBA.3	5'-GAGAACCCACTGCTTACTGGC -3
IBA.5	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG -3

5.1.5 Vektoren und Plasmide

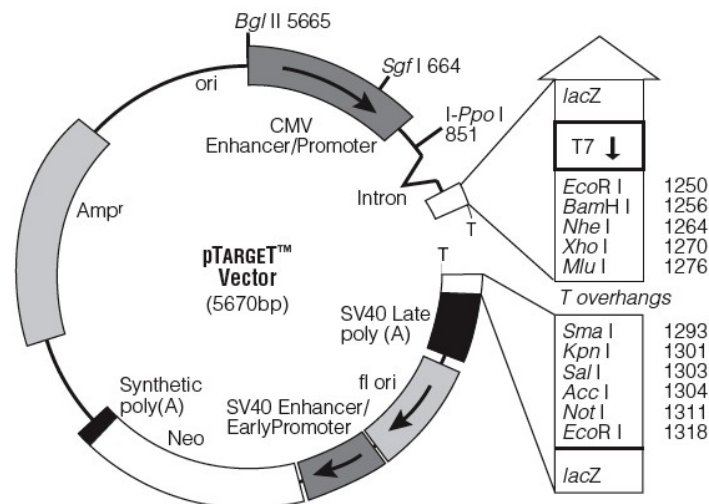
pEXPR-IBA103/105 (IBA GmbH):



Der pEXPR-IBA ist ein Expressions-Vektor-System für Säugerzellen, das den CMV-Promotor enthält und für stabile sowie transiente Expression einsetzbar ist. Zusätzlich ist in diesen Vektoren ein Strep-Tactin-Affinitätstag (Strep-Tag 2) enthalten, welcher eine spezifische Isolierung des rekombinanten Proteins bzw.

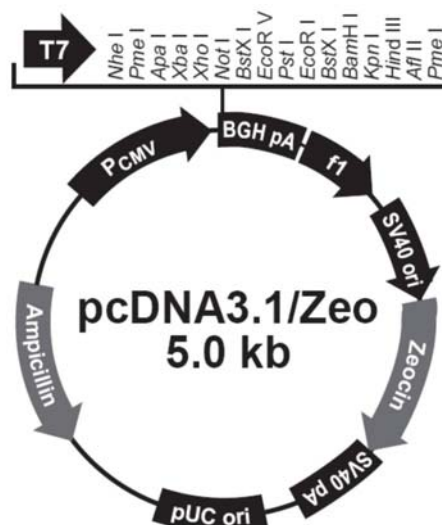
des zugehörigen Proteinkomplexes ermöglicht. Der Strep-Tag befindet sich bei Verwendung des pEXPR-IBA103 am C-Terminus des rekombinanten Proteins, für den pEXPR-IBA105 hingegen am N-Terminus.

pTarget (Promega):



Der pTarget-Vektor ist ebenfalls ein Expressions-Vektor-System für Säugerzellen, das sowohl für transiente als auch für stabile Expression verwendet werden kann. Er beinhaltet die Enhancer/Promotorregion des humanen *Cytomegalovirus* (CMV), welche eine konstitutive Expression ermöglicht und somit eine effiziente Expression in Säugerzellen gewährleistet.

pcDNA3.1/Zeo(-)(Invitrogen):



Der pcDNA3.1/Zeo(-) ist gleichermaßen mit einem CMV-Promotor ausgestattet und für die transiente bzw. stabile Expression in Säugerzellen geeignet.

5.1.6 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper:

Name	Organismus	Verdünnung	Beschreibung / Hersteller
<i>AF4-Komplex</i>			
anti-AF4 • N	Maus	1:500	Gereinigter monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des humanen AF4 Proteins; Hybridoma-Klon 6E9/5 (AK Marschalek)
anti-AF4 • C	Kaninchen	1:500	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des AF4 (Abcam)
anti-PC3	Kaninchen	1:100	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des menschlichen CBX8 (Abgent)
anti-Siah-1	Ziege	1:1000	Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des menschlichen Siah-1 (Santa Cruz Biotechnology)
anti-AF9	Kaninchen	1:100	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des menschlichen AF9 (Abgent)
anti-AF10	Maus	1:100	Monoklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 695 - 794 des menschlichen AF10 gerichtet ist (Abcam)
anti-ENL	Kaninchen	1:100	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des menschlichen ENL (Abgent)
anti-Dot1L	Kaninchen	1:100	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des menschlichen Dot1L (Abgent)
anti-CDK9	Kaninchen	1:500	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des menschlichen CDK9 (Santa Cruz Biotechnology)
anti-CCNT1 (CyclinT1)	Kaninchen	1:500	Polyklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 261-505 des menschlichen Cyclin T1 gerichtet ist (Santa Cruz Biotechnology)

anti-Cyclin T2	Maus	1:100	Monoklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des menschlichen Cyclin T2 (Abcam)
anti-Brd4 • N17	Ziege	1:200	Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des menschlichen Brd4 (Santa Cruz Biotechnology)
anti-Brd4	Kaninchen	1:1000	Polyklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1347 - 1362 des menschlichen Brd4 gerichtet ist (Abcam)
anti-Hexim1	Kaninchen	1:400	Polyklonaler Antikörper, der gegen die letzten 300 Aminosäuren menschlichen Hexim1 gerichtet ist (Abcam)
anti-RNA-Polymerase II-CTD [4H8]	Maus	1:5000	Monoklonaler Antikörper, der phosphorylierte und nicht-phosphorylierte RNA Polymerase II erkennt (Abcam)
anti-Ring1	Kaninchen	1:200	Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des menschlichen Ring1, Isoform 1 (Abcam)
anti-NFκB	Kaninchen	1:400	Polyklonaler Antikörper, der gegen die C-terminalen Aminosäuren 532-551 des NFκB p65 gerichtet ist (Abcam)
anti-NPM	Maus	1:250	Monoklonaler Antikörper der gegen die letzten 68 C-terminalen Aminosäuren des NPM gerichtet ist (Abcam)
anti-DDX6	Kaninchen	1:5000	Polyklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid der ersten 50 N-terminalen Aminosäurendes humanen DDX6 (Abcam)
MLL-Komplex			
anti-MLL • 27(1)	Maus	1:100	Gereinigter monoklonaler Antikörper gegen den mittleren Teil des humanen MLL Proteins, vor der Taspase-Schnittstelle, Hybridoma-Klon 5E1 (AK Marschalek)

anti-MLL1	Kaninchen	1:1000	Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des menschlichen MLL (Bethyl Laboratories)
anti-MOF	Ziege	1:500	Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des menschlichen MOF (Santa Cruz Biotechnology)
anti-Ash2L	Maus	1:100	Monoklonaler Antikörper gegen Ash2L (Abcam)
anti-WDR5	Kaninchen	1:200	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des menschlichen WDR5 (Abcam)
anti-RbBP5	Kaninchen	1:1000	Polyklonaler Antikörper, der gegen die C-terminalen Aminosäuren 500-538 des RbBP5 gerichtet ist (Abcam)
anti-CBP	Maus	1:50	Monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes CBP (Abcam)
anti-CYP33	Maus	1:1000	Monoklonaler Antikörper gegen CYP33 (Abcam)
anti-HIP2	Kaninchen	1:100000	Monoklonaler Antikörper gegen menschliches HIP2 (Abcam)
anti-E2F4	Maus	1:100	Monoklonaler Antikörper gegen E2F4 (Abcam)
anti-E2F6	Maus	1:1000	Monoklonaler Antikörper gegen das komplette E2F6 (Abcam)
anti-Ring2	Kaninchen	1:600	Polyklonaler Antikörper der gegen die Aminosäuren 156-204 des menschlichen Ring2 gerichtet ist (Abcam)
anti-Gadd34	Ziege	1:500	Polyklonaler Antikörper der gegen die Aminosäuren 664-674 (C-Terminus) des menschlichen Gadd34 gerichtet ist (Abcam)
anti-SmarcB1	Kaninchen	1:1000	Polyklonaler Antikörper gegen menschliches SmarcB1 (Abcam)
anti-N-Cor (C-20)	Ziege	1:500	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des murinen N-Cor (Santa Cruz Biotechnology)

anti-HCF1	Ziege	1:500	Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des menschlichen HCF1 (Santa Cruz Biotechnology)
anti-HCF2	Maus	1:100	Monoklonaler Antikörper gegen ein menschliches rekombinantes Peptid des HCF2 (Abcam)
Tags			
anti-Flag	Maus	1:1000	Monoklonaler Antikörper gegen das Flag-Peptid (DYKDDDDK), (Sigma)
anti-Strep	Maus	1:400	Monoklonaler Antikörper gegen den Strep-Tag (WSHPQFEKGGGSGGGGSGGGWSHPQFEK), der aber schon mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (IBA GmbH)
anti-GFP	Maus	1:200	Monoklonaler Antikörper gegen das komplette Protein (Green Fluorescent Protein) aus <i>Aequorea victoria</i> (Santa Cruz Biotechnology)

Sekundäre Antikörper:

Name	Verdünnung	Beschreibung / Hersteller
anti-Mouse	1:10000	anti Maus Ig (GE Healthcare)
anti-Rabbit	1:10000	anti Kaninchen Ig (GE Healthcare)
anti-Goat	1:10000	anti Ziege Ig (Vector Laboratories)

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Standardmethoden

Im Folgenden sind die molekularbiologischen Standardmethoden aufgelistet. Sie werden nicht detailliert besprochen, da sie den Protokollsammlungen zu entnehmen sind (Sambrook *et al.*, 2001).

- Gelelektrophoresen (DNA und Protein)
- Dephosphorylierung von DNA-5' Enden mit alkalischer Phosphatase (NEB)
- Phosphorylierung von DNA mittels Polynukleotidkinase (NEB)
- Annealing von Oligonukleotiden
- Fällungsmethoden für Nukleinsäuren
- Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli* (Promega)
- Minilysat Präparation von Plasmid DNA nach der ST-Präparationsmethode
- Ligations-Reaktionen (NEB)
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA)
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (NEB)
- Transformation von *E. coli* mit CaCl_2
- Elektroporation von *E.coli*
- PCR Analysen
- Gelextraktion und Reinigung von DNA (Quiagen)

5.2.2 Sequenzanalysen

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt. Es handelt sich hierbei entsprechend der Herstelleranleitung um eine Kettenabbruchmethode. Sie ermöglicht eine auf unterschiedlichen Fluoreszenz-Signalen basierende Sequenzierung von Einzel- oder Doppelstrang-DNA im ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer.

5.3 Zelltransfektion

Die Transfektion der 293T Zellen wurde mit Hilfe des PEI/Polyethylenimin durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf Zellkulturschalen/-bzw. platten ausgebracht: ca. 5×10^6 Zellen auf eine Zellkulturschale (\varnothing 15 cm, 25 ml Medium) bzw. ca. $1,75 \times 10^7$ Zellen auf eine

Zellkulturplatte (500 cm², 100 ml Medium). 1-2 Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel.

Der Ansatz für das Transfektionsreagenz ist im Folgenden dargestellt:

Lösung A (PEI:PBS, 1:5)

Zellkulturschale	450 µl PBS + 90 µl 10 mM PEI-Lösung
Zellplatte	1605 µl PBS + 321 µl 10 mM PEI-Lösung

Lösung B

Zellkulturschale	450 µl PBS + 25 µg DNA
Zellplatte	1605 µl PBS + 80 µg DNA

Für die Transfektion wurde Lösung B tröpfchenweise in Lösung A pipettiert, während Lösung A dabei mit konstantem Vortexen behandelt wurde. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei RT bevor das Transfektionsreagenz gleichmäßig über die Zellen verteilt wurde. Anschließend wurden die Zellen für 48h im Brutschrank inkubiert.

Für einige Experimente war es zusätzlich notwendig 6 - 24 h vor dem Ernten der Zellen 5 µM des Proteasominhibitors MG132 zuzugeben.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 SDS-PAGE

Es wurden sowohl Gele mit einer homogenen Acrylamidkonzentration (Minigele) als auch Gele mit einem Acrylamidgradienten (T: 7-15 %, Maxigele) gegossen. Für die Gradientengele (Maxigele) wurde ein Gradientenmischer (Biorad Laboratories) und eine Schlauchpumpe eingesetzt. Für die Herstellung aller Gele wurde eine Acrylamidlösung (30 % Acrylamid, 0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid, 30 % T, 2,6 % C) verwendet, die neben dem Acrylamid den Quervernetzer Methylenbisacrylamid enthielt. Für die Minigele wurde eine Stromstärke von 40 mA pro Gel angelegt, während die Maxigele bei 15 mA pro Gel gestartet und nach einer halben Stunde auf 25 mA pro Gel hochgestellt wurden.

Zusammensetzung für ein Minigel (5 ml Trenngel/ 3 ml Sammelgel):

	7,5 %	10 %	12 %	15 %
Wasser	1,8 ml	1,4 ml	1,1 ml	0,55 ml
Trenngelpuffer	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml
AA/BA	1,25 ml	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
APOD (10 %)	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
TEMED	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl

Sammelgel (4 %)

Wasser	2,2 ml
Sammelgelpuffer	0,375 ml
AA/BA	0,39 ml
10 % SDS	30 µl
APOD (10 %)	15 µl
TEMED	3 µl

Gradientengel

15 %		7 %
0,70 ml	Wasser	4,09 ml
4,125 ml	Trenngelpuffer	4,125 ml
5,5 ml	Acrylamid	2,62 ml
110 µl	10 %ige SDS-Lösung	110 µl
0,50 ml	Glycerol	-
50 µl	1 %ige Bromphenolblaulösung	-
55 µl	APOD (10 %)	55 µl
5,5 µl	TEMED	5,5 µl

5.4.2 Färbemethoden

Coomassie Blau-Färbung (Standard):

Direkt im Anschluss an die elektrophoretische Trennung wurden die Gele für 20 bis 30 min in der Färbelösung geschüttelt. Daraufhin wurde die Färbelösung entfernt und die Gele in Entfärbelösung unter Schütteln inkubiert. Die Entfärbelösung wurde mehrmals gewechselt und so lange auf den Gelen

belassen bis das gewünschte Ergebnis erreicht war. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt ungefähr bei 0,1 µg Protein pro Bande.

Kolloidale Coomassie Färbung nach Neuhoff:

Herstellung der Stammlösungen:

Stammlösung I:

3 – 4 g Coomassie in 250 ml 7,5 % Essigsäure lösen und auf 60 - 70°C anwärmen. Festes Ammoniumsulfat einrühren bis zu einer Endkonzentration von 30 % (g/V). Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgt die Gewinnung des präzipitierten Farbstoffes durch Filtrieren oder Zentrifugieren. Das Sediment wird in 100 ml warmen Methanol vollständig aufgelöst und es werden 200 ml Aceton zugegeben.

Stammlösung II:

100 g Ammoniumsulfat in 500 ml Wasser lösen und langsam 20 g Phosphorsäure unter Rühren zutropfen lassen. Mit Wasser auf 800 ml auffüllen.

Vor Gebrauch werden 200 ml Stammlösung II und 20 ml Stammlösung I mit 30 ml Methanol gemischt. Dies stellt die fertige Färbelösung dar. Sie kann mehrmals verwendet werden.

Das Färben:

Direkt nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele für mindestens eine Stunde in der Fixierlösung geschwenkt. Anschließend wurde die Färbelösung auf die Gele gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gele für ein bis drei Minuten in der Neutralisierungslösung geschwenkt bevor sie für maximal eine Minute mit der Waschlösung behandelt wurden. Zum Stabilisieren der Proteine im Gel wurden die Gele anschließend in die Stabilisierungslösung gegeben. Dort konnten sie für längere Zeit aufbewahrt werden.

Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt bei > 30 ng Protein pro Bande bzw. bei 0,7 ng BSA/ mm². *Electrophoresis* 9, 225-262 (1988), *Electrophoresis* 6, 427-448 (1985)

5.4.3 Western Blot

Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte überwiegend in 3 % BSA mit 0,1 % Tween20 in TBS. Falls sich dies als nicht geeignet erwies, wurde auf eine Verdünnung in 5 % Milchpulver mit 0,1 % Tween20 in TBS umgestellt. Die entsprechenden Lösungen wurden ebenso zum Blockieren und zum Verdünnen des Zweitantikörpers eingesetzt.

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Hybond-P PVDF-Membran der Firma GE Healthcare erfolgte mit Hilfe der *Semidry*-Technik bei 1 mA/cm² für 1-1,5 Stunden. Hierbei wurde entweder Anoden-Puffer I / II und Kathoden-Puffer oder für Proteine mit einem Molekulargewicht über 200 kDa CAPS-Transferpuffer verwendet.

Im Anschluss an den Proteintransfer wurde die PVDF-Membran mit der zugehörigen Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blockieren wurde die Hybridisierung über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am folgenden Tag wurde 3 Mal für 5 min mit 0,1 % Tween20 in TBS gewaschen, anschließend mit dem entsprechendem Zweitantikörper (Verdünnung 1:10000) 1 h bei RT hybridisiert und wiederholt 3 Mal für 5 min mit 0,1 % Tween20 in TBS gewaschen. Abschließend wurde der Blot unter Verwendung des *ECL Western Blotting Analysis System* der Firma GE Healthcare entwickelt. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte je nach Bedarf über einen Zeitraum von 2 min bis 2 h.

5.4.4 Proteinreinigung

5.4.4.1 Spezifische Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin

Zur Reinigung der Proteine mit Strep-Tag wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet: Reinigung über eine Strep-Tactin-Säule (IBA GmbH) oder Reinigung mittels Strep-Tactin-Suspension (50 %, IBA GmbH) und kleinen Chromatographiesäulen (BioRad®).

Die massenspektrometrischen Experimente wurden lediglich mit Elutionen durchgeführt, welche über die Reinigung mittels Strep-Tactin-Säule gewonnen wurden, da sich dieses Protokoll der Reinigung als spezifischer herausstellte. Western Blot-Analysen erfolgten hingegen unter Verwendung von Elutionen aus beiden Reinigungsvarianten.

Protokoll zur Reinigung über eine Strep-Tactin-Säule (0,2 ml Volumen):

Ungefähr 5×10^8 transient transfizierte 293T-Zellen wurden in 5 ml Lysis-Puffer resuspendiert, auf sechs 1,5 ml Caps aufgeteilt und 1 Stunde bei 4°C rotiert. Es folgte eine Zentrifugation des Lysats für 30 min bei 4°C mit 14.000 rpm. Der hierbei gewonnene Überstand wurde in neue Caps überführt sowie mit je 1 µl Avidin Lösung (10 µg/ µl, IBA GmbH) pro Cap für 15 min bei 4°C inkubiert, um die irreversible Bindung biotinylierter Proteine an Strep-Tactin-Material zu verhindern. Anschließend wurde wiederholt 30 min bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit Lysispuffer zu einem Volumen von ca. 8 ml verdünnt. Nach der Equilibrierung der Säule mit 0,4 ml Waschpuffer, wurde das verdünnte Lysat 2 Mal über die Säule laufen gelassen. Danach wurden 5 Waschschrte mit 0,2 ml Waschpuffer sowie 6 Elutionen mit Elutionspuffer 1 oder 2 durchgeführt.

Für die Elution wurde entweder ein Elutionspuffer mit 2 mM Biotin oder mit 5 mM Desthiobiotin eingesetzt. Die Verwendung des Desthiobiotin hat den Vorteil, dass die mit dem Strep-Tag konkurrierende Bindung an die Affinitätsmatrix reversibel ist und somit eine Regenerierung des Säulenmaterials über den HABA-Puffer möglich ist. In diesem Falle wird die Säule 3 Mal mit dem 5-fachen Säulenvolumen HABA-Puffer versetzt und

anschließend mit Waschpuffer überschichtet bei 4°C aufbewahrt. Die Säule kann zwar auf diese Weise im Gegensatz zum Biotin mehrfach verwendet werden, jedoch ist die Ausbeute durch Elution mit Desthiobiotin weitaus geringer.

Über SDS-PAGE und Western Blot wurde abschließend die Elutionseffizienz überprüft.

Protokoll zur Reinigung mittels Strep-Tactin-Suspension und kleinen Chromatographiesäulen:

Die ca. $1,5 \times 10^8$ transient transfizierten 293T-Zellen wurden in 0,6 ml Lysis-Puffer resuspendiert und 1 Stunde bei 4°C rotiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation des Lysats bei 4°C mit 14.000 rpm, wurde wiederum der gewonnene Überstand überführt und mit 1 µl Avidin Lösung (10 µg/ µl, IBA GmbH) pro Cap für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde wiederholt 30 min bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Reinigung verwendet.

Für die Equilibrierung der Strep-Tactin-Suspension wurden 150 µl derselben in ein Chromatographiesäulchen (BioRad®) pipettiert und sowohl mit 500 µl Waschpuffer als auch mit 500 µl Lysispuffer equilibriert. Jeder Schritt beinhaltete hier eine kurze Zentrifugation für 5 Sekunden bei 0,8 rpm, wobei sich das Chromatographie-säulchen auf einem 2 ml Cap befand. Um nach der Equilibrierung eine Inkubation mit dem Lysat zu ermöglichen, wurde die Säule an beiden Enden verschlossen. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rotator. Die anschließenden Waschschrte wurden 5 Mal mit 700 µl Waschpuffer und entsprechend der Equilibrierungsschritte durchgeführt. Die Elution erforderte wieder das Verschließen der Säule, wobei mit 120 µl Elutionpuffer 3 für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Schritt wiederholt. Über SDS-PAGE und Western Blot wurde gleichermaßen die Elutionseffizienz überprüft.

5.4.4.2 Tandem-Affinitätsreinigung mittels Strep- und Flag-Tag

Die Durchführung einer Tandem-Affinitätsreinigung unter Verwendung eines zusätzlichen Flag-Tag am N-Terminus sollte die Anzahl unspezifischer Proteine in den Elutionen weiter verringern. Auf die Reinigung der Proteine bzw. der Proteinkomplexe mittels Strep-Tactin-Säulen oder Strep-Tactin-Suspension folgte somit die Reinigung über das Flag-Tag-System.

Bevor die Flag-Beads mit den Strep-Tag-Elutionen inkubiert werden konnten, mussten diese zunächst equilibriert werden. In diesem Falle wurden nun ca. 80 µl Flag-Beads in eine Chromatographiesäule gefüllt und 2 Mal mit TBS-Puffer gewaschen. Damit kein ungebundener Flag-Antikörper mehr an den Beads haftet, wurden diese 3 Mal mit 0,1 M Glycinlösung pH 3,5 gewaschen. Nach erneutem Waschen mit TBS-Puffer konnten die Flag-Beads nun mit der Elution aus der Strep-Reinigung über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert werden. Am nächsten Tag wurde erst der Durchlauf gesammelt und anschließend die Beads 1 Mal mit 500 µl Wasch-Puffer und 4 Mal mit 500 µl TBS-Puffer gewaschen (Durchführung siehe 2.4.4.1).

Für die Elution wurden die Beads 2 Mal mit je 100 µl 2x-Lämmli-Puffer 10 min bei RT inkubiert und dann zentrifugiert. Versuche die Komplexe, durch kompetitive Verdrängung mittels Flag-Peptid in einem Flag-Elutionspuffer, von den Beads zu lösen, scheiterten. Um diese Form der Reinigung kompatibel zu LC-MS-Experimenten durchzuführen, wurde an Stelle von 2x-Lämmli-Puffer ein Puffer mit 100 mM Tris pH 6,8, 2% SDS und 200 mM DTT verwendet. Die so erhaltene Elution musste vor einem Lösungsverdau zunächst umgepuffert werden.

Die Überprüfung der Elutionseffizienz erfolgte abschließend über SDS-PAGE und Western Blot.

5.4.5 Immunopräzipitationen

Ungefähr $1,5 \cdot 10^8$ transient transfizierte 293T-Zellen wurden in 0,6 ml Lysis-Puffer resuspendiert und für 1 Stunde bei 4°C rotiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation des Lysats bei 4°C mit 14.000 rpm, wurde der Überstand in einem neuen Cap mit 50 µl Protein G Agarose Beads 30 min bei 4°C inkubiert.

Auf diese Weise sollten unspezifische Bindungen an die Protein G Agarose Beads minimiert werden. Die Beads wurden anschließend durch kurze Zentrifugation separiert und der Überstand auf ein Chromatographiesäulchen gegeben. Anschließend wurde die Probe mit 5-10 µl des unverdünnten Antikörpers versetzt, erst 1 h bei RT und danach über Nacht bei 4°C rotiert. Am folgenden Tag wurden weiterhin 60 µl Protein G Agarose hinzu pipettiert bevor erneut 3-4 h bei 4°C inkubiert wurde. Nach 5 Waschschritten mit je 500 µl TBS-Puffer erfolgte die Elution durch Inkubation mit 100 µl zuvor auf 80°C erwärmtem 2x-Lämmli-Puffer für 15 min bei RT sowie abschließender Zentrifugation.

5.4.6 Antikörperreinigung

Die Reinigung des α -AF4-N-Antikörpers erfolgte aus Zellüberstand einer Hybridomazelllinie, die in DMEM-Medium mit 10 % FCS kultiviert wurde. Um 8 - 9 ml einer ca. 2 mg/ml konzentrierten Antikörperlösung zu erhalten, wurden 300 ml Zellüberstand eingesetzt (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. Ilse Zündorf). Die folgenden Reinigungsschritte erfolgten sämtlich bei 4°C.

Zur Beseitigung von restlichen Zellbestandteilen aus dem Überstand, wurde dieser 10 min bei 1.500 rpm zentrifugiert. Der hierbei erhaltene Überstand wurde mit 10x Bindepuffer versetzt, so dass dieser auf die einfache Konzentration verdünnt wurde. Parallel wurde eine Polypropylensäule mit 2 ml Protein-G-Sepharose (50 %-Lösung) versetzt. Die Equilibrierung der Protein-G-Sepharose erfolgte durch Zugabe von 5 ml 1x Bindepuffer. Anschließend wurde das Gemisch aus Zellüberstand und Bindepuffer mittels eines Scheidetrichters mit einer Geschwindigkeit von ca. 100 ml pro Stunde über die Säule geleitet. Es folgten 10 Waschschritte à 1 ml 1x Bindepuffer. Die Elution wurde mit 15x 500 µL Elutionspuffer durchgeführt, wobei in die Elutionsgefäße je 60 µl Neutralisationspuffer vorgelegt werden musste.

Im Anschluss an die Reinigung wurde die mit Protein-G-Sepharose gefüllte Säule erneut mit 10 ml 1x Bindepuffer equilibriert. Die Protein-G-Sepharose wurde regeneriert, indem sie zunächst für 1 min bei 37°C in 0,1 % Triton-X-100

inkubiert wurde. Es folgte eine Re-Equilibration mit 1x Bindepuffer und eine Inkubation in 70 % Ethanol für 12 h. Nach einer zweiten Re-Equilibration mit 1x Bindepuffer, konnte die Säule in 20 % Ethanol bei 4°C gelagert werden.

Zur Überprüfung des Reinigungsverlaufs wurden je 15 µl der erhaltenen Proben mit 5 µl 2x-Lämmli-Ladepuffer versetzt und in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Quantifizierung des Antikörpers erfolgte über Proteinbestimmung mit dem BCA-Kit. Nach Vereinigung der Elutionen mit den höchsten Antikörperkonzentrationen wurde die gesamte Probe in einen Dialyseschlauch (10.000 Da cut-off, regenerierte Cellulose) überführt und dieser anschließend mit Clips verschlossen. Die Dialyse erfolgte 2 Mal bei 4°C gegen 500 ml PBS-Puffer, wobei der erste Schritt nur 1 h dauerte und der zweite die komplette Nacht. Die auf diesem Weg gewonnene Antikörperlösung wurde abschließend aliquotiert sowie bei -20°C eingefroren.

5.4.7 Größenausschlusschromatographie

Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie sollte die Größe der Proteinkomplexe näherungsweise bestimmt werden. Als Probe dienten 500 µl Zelllysate aus ca. $1,5 \times 10^8$ transient transfizierten Zellen. Das Säulenmaterial bestand aus Superose-6 10/300 und das Säulenvolumen betrug 23,56 ml. Ein Lauf dauerte ca. 2,5 Stunden wobei 1 mM DTT in PBS als Laufpuffer diente. Es wurden 36 Fraktionen á 1 ml aufgefangen. Um die Größe der Proteinkomplexe abschätzen zu können, wurde zuvor ein Chromatogramm einer Standardproteinmischung aufgenommen. Daraus resultierte folgende Größenzuordnung der einzelnen Fraktionen:

Fraktion	Größe (M _r)	Standardprotein
9	2 000 000	Blue Dextran 2000
13	669 000	Thyroglobulin
15	440 000	Ferritin
17	158 000	Aldolase

Die erste Fraktion, die den Proteinkomplex enthielt wurde mittels Western Blot ermittelt und zur Bestimmung der Maximalgröße herangezogen.

5.5 Massenspektrometrie

5.5.1 Tryptischer Verdau der Proteine

Der In-Gel-Verdau wurde nach dem Protokoll von Shevchenko durchgeführt (Shevchenko *et al.*, 1996).

Für den In-Lösung-Verdau wurden 60 µl von jeder Elutionsprobe über einen Vivaspin 500 Zentrifugaleinheit konzentriert und in 25 mM NH₄HCO₃-Probenpuffer (pH 8,0) umgepuffert. Nach Reduzierung der Proben mit DTT-Lösung und Alkylierung mit IAA-Lösung für jeweils 1 h, wurde der proteolytische Verdau durch Zugabe von 0,5 µg Trypsin (Sigma) gestartet und anschließend 24 h bei 37°C inkubiert. Das überschüssige IAA wurde vor dem Verdau mit DTT-Lösung abgefangen. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl konzentrierter Ameisensäure beendet.

5.5.2 nLC-MALDI-MS/MS und Datenbanksuche

Der NanoLC (nLC) Aufbau, die Konfiguration der Instrumente und die Datenerfassung bzw. -bearbeitung wurden nach Rietschel *et al.* durchgeführt (Rietschel *et al.*, 2009).

Für die Datenbanksuche wurde die MASCOT™ Datenbank Suchmaschine v2.2.03 (Matrix Science Ltd., UK; Perkins *et al.*, 1999) verwendet. Folgende Suchparameter wurden eingestellt: Es wurde die Datenbank SwissProt und der Organismus Homo sapiens ausgewählt. Trypsin wurde als Enzym gewählt. Als fixe Modifikation wurde die Carbamidmethylierung der Cysteine angegeben und die Methioninoxidation als variable Modifikation. Es wurde mit 2 überlesenen Schnittstellen („*mis-cleavage*“), einer Peptidmassentoleranz für den Precursor von 30ppm und einer MS/MS-Toleranz von 0,3 Da für die Fragmente gesucht.

5.6 In vitro Methyltransferase-Assay

Als Vorbereitung des Methyltransferase-Assays musste zunächst eine Strep-Tag-Reinigung des zu testenden Proteinkomplexes hergestellt werden. Eine GST-fusionierte Protein-Arginin-Methyltransferase 6 (GST-PRMT) als Positivkontrolle sowie ein ebenfalls an GST fusioniertes und rekombinantes H3-Peptid (Aminosäuren 1-46 des H3 Histons) wurden uns freundlicher Weise von Julia Herglotz (aus der Arbeitsgruppe von Dr. Lausen am Georg-Speyer-Haus) zur Verfügung gestellt.

Für die Durchführung des Methyltransferase-Assays wurden 5-20 μ l methylierender Komplex, in diesem Falle GST-PRMT oder der über Strep-Tag gereinigte Komplex (gereinigter Komplex aus ca. $1-3,5 \times 10^7$ Zellen), mit 30 μ l GST-H3-Peptid (3 μ g) bzw. 15 μ l Core Histone (15 μ g) und 4 μ l Tritium markiertem S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-(methyl-3H) (1-2 μ Ci 3 H-SAM; 55-85 Ci/mMol) für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von Protein-Ladepuffer zu jeder Probe wurden diese über Nacht bei 4°C gelagert. Am zweiten Versuchstag wurden die Proben in einer 15-18%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Zusätzlich wurden noch zwei weitere Spuren mit Proteinmarker und Core Histonen aufgetragen, welche später als Laufhöhenreferenz dienen sollten. Diese beiden Spuren wurden anschließend in Coomassie gefärbt. Das restliche Gel mit den Proben wurde hingegen zunächst für ca. 30 min in Fixierlösung und anschließend für 30 min in Enhancerlösung inkubiert. Nach 3 10-minütigen Waschschritten in Wasser wurde das Gel unter Vakuum bei 65°C für ca. 1,5 h getrocknet. Das markierte Substrat wurde nach 4 wöchiger Exposition über Fluorographie detektiert.

6 Literaturverzeichnis

Adler, H. T., Chinery, R., Wu, D. Y., Kussick, S. J., Payne, J. M., Fornace, A. J., Jr., and Tkachuk, D. C. (1999). Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol* 19, 7050-7060.

Adler, H. T., Nallaseth, F. S., Walter, G., and Tkachuk, D. C. (1997). HRX leukemic fusion proteins form a heterocomplex with the leukemia-associated protein SET and protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 272, 28407-28414.

Akao, Y., and Isobe, M. (2000). Molecular analysis of the rearranged genome and chimeric mRNAs caused by the t(6;11)(q27;q23) chromosome translocation involving MLL in an infant acute monocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 27, 412-417.

Barboric, M., Nissen, R. M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B. M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* 8, 327-337.

Barkett, M., and Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6910-6924.

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

Bertrand, F. E., Spengeman, J. D., Shah, N., and LeBien, T. W. (2003). B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia* 17, 2454-2459.

Bertz, J., Giersiepen K., Haberland J., Hentschel S., Kaatsch P., Katalinic A., Stabenow R., Stegmaier C., and Ziegler H. (2006). Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends, pp. 110, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut, Saarbrücken.

Bitoun, E., Oliver, P. L., and Davies, K. E. (2007). The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum Mol Genet* 16, 92-106.

Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., and Nigg, E. A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379-390.

Bursen, A., Moritz, S., Gaussmann, A., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2004). Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* 23, 6237-6249.

Bursen, A., Schwabe K., Rüster B., Henschler R., Ruthardt M., Dingermann T., Marschalek R. (2009 submitted). The AF4-MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL-AF4.

Butler, L. H., Slany, R., Cui, X., Cleary, M. L., and Mason, D. Y. (1997). The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* 89, 3361-3370.

Caslini, C., Serna, A., Rossi, V., Introna, M., and Biondi, A. (2004). Modulation of cell cycle by graded expression of MLL-AF4 fusion oncoprotein. *Leukemia* 18, 1064-1071.

Caslini, C., Yang, Z., El-Osta, M., Milne, T. A., Slany, R. K., and Hess, J. L. (2007). Interaction of MLL amino terminal sequences with menin is required for transformation. *Cancer Res* 67, 7275-7283.

Chakrabarti, L., Knight, S. J., Flannery, A. V., and Davies, K. E. (1996). A candidate gene for mild mental handicap at the FRAXE fragile site. *Hum Mol Genet* 5, 275-282.

Chen, C. S., Hilden, J. M., Frestedt, J., Domer, P. H., Moore, R., Korsmeyer, S. J., and Kersey, J. H. (1993). The chromosome 4q21 gene (AF-4/FEL) is widely expressed in normal tissues and shows breakpoint diversity in t(4;11)(q21;q23) acute leukemia. *Blood* 82, 1080-1085.

Chen, C. S., Sorensen, P. H., Domer, P. H., Reaman, G. H., Korsmeyer, S. J., Heerema, N. A., Hammond, G. D., and Kersey, J. H. (1993). Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 81, 2386-2393.

Chen, F. E., and Ghosh, G. (1999). Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* 18, 6845-6852.

Chen, W., Li, Q., Hudson, W. A., Kumar, A., Kirchhof, N., and Kersey, J. H. (2006). A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* 108, 669-677.

Chen, Y. X., Yan, J., Keeshan, K., Tubbs, A. T., Wang, H., Silva, A., Brown, E. J., Hess, J. L., Pear, W. S., and Hua, X. (2006). The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1018-1023.

Cho, Y. W., Hong, T., Hong, S., Guo, H., Yu, H., Kim, D., Guszczynski, T., Dressler, G. R., Copeland, T. D., Kalkum, M., and Ge, K. (2007). PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *J Biol Chem* 282, 20395-20406.

Chu, C. Y., and Rana, T. M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* 4, e210.

Cimino, G., Moir, D. T., Canaani, O., Williams, K., Crist, W. M., Katzav, S., Cannizzaro, L., Lange, B., Nowell, P. C., Croce, C. M., and et al. (1991). Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. *Cancer Res* 51, 6712-6714.

Cleary, M. L. (1991). Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* 66, 619-622.

Colombo, E., Marine, J. C., Danovi, D., Falini, B., and Pelicci, P. G. (2002). Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4, 529-533.

Corral, J., Lavenir, I., Impey, H., Warren, A. J., Forster, A., Larson, T. A., Bell, S., McKenzie, A. N., King, G., and Rabbitts, T. H. (1996). An MLL-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* 85, 853-861.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. C., and Croce, C. M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824-7827.

Daser, A., and Rabbitts, T. H. (2005). The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. *Semin Cancer Biol* 15, 175-188.

Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8758-8763.

Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., Coleman, A. E., Maruyama, T., Sciortino, S., Lippincott-Schwartz, J., and Ozato, K. (2000). A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition. *Mol Cell Biol* 20, 6537-6549.

Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* 399, 491-496.

DiMartino, J. F., Ayton, P. M., Chen, E. H., Naftzger, C. C., Young, B. D., and Cleary, M. L. (2002). The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10. *Blood* 99, 3780-3785.

DiMartino, J. F., Miller, T., Ayton, P. M., Landewe, T., Hess, J. L., Cleary, M. L., and Shilatifard, A. (2000). A carboxy-terminal domain of ELL is required and sufficient for immortalization of myeloid progenitors by MLL-ELL. *Blood* 96, 3887-3893.

Dobson, C. L., Warren, A. J., Pannell, R., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (2000). Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene Mll and the bacterial lacZ gene. *Embo J* 19, 843-851.

Domer, P. H., Fakharzadeh, S. S., Chen, C. S., Jockel, J., Johansen, L., Silverman, G. A., Kersey, J. H., and Korsmeyer, S. J. (1993). Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7884-7888.

Dou, Y., Milne, T. A., Tackett, A. J., Smith, E. R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C. D., Chait, B. T., Hess, J. L., and Roeder, R. G. (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* 121, 873-885.

Eberhardy, S. R., and Farnham, P. J. (2001). c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J Biol Chem* 276, 48562-48571.

Erfurth, F., Hemenway, C. S., de Erkenez, A. C., and Domer, P. H. (2004). MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia* 18, 92-102.

Ernst, P., Mabon, M., Davidson, A. J., Zon, L. I., and Korsmeyer, S. J. (2004). An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol* 14, 2063-2069.

Ernst, P., Wang, J., Huang, M., Goodman, R. H., and Korsmeyer, S. J. (2001). MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* 21, 2249-2258.

Estable, M. C., Naghavi, M. H., Kato, H., Xiao, H., Qin, J., Vahlne, A., and Roeder, R. G. (2002). MCEF, the newest member of the AF4 family of transcription factors involved in leukemia, is a positive transcription elongation factor-b-associated protein. *J Biomed Sci* 9, 234-245.

Fair, K., Anderson, M., Bulanova, E., Mi, H., Tropschug, M., and Diaz, M. O. (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* 21, 3589-3597.

Felix, C. A., Hosler, M. R., Slater, D. J., Megonigal, M. D., Lovett, B. D., Williams, T. M., Nowell, P. C., Spinner, N. B., Owens, N. L., Hoxie, J., et al. (1999). Duplicated regions of AF-4 intron 4 at t(4;11) translocation breakpoints. *Mol Diagn* 4, 269-283.

Frestedt, J. L., Hilden, J. M., Moore, R. O., and Kersey, J. H. (1996). Differential expression of AF4/FEL mRNA in human tissues. *Genet Anal* 12, 147-149.

Fu, J., Yoon, H. G., Qin, J., and Wong, J. (2007). Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation. *Mol Cell Biol* 27, 4641-4651.

Fugmann, S. D., Lee, A. I., Shockett, P. E., Villey, I. J., and Schatz, D. G. (2000). The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition. *Annu Rev Immunol* 18, 495-527.

Garcia-Cuellar, M. P., Schreiner, S. A., Birke, M., Hamacher, M., Fey, G. H., and Slany, R. K. (2000). ENL, the MLL fusion partner in t(11;19), binds to the c-Abl interactor protein 1 (ABI1) that is fused to MLL in t(10;11)+. *Oncogene* 19, 1744-1751.

Garcia-Cuellar, M. P., Zilles, O., Schreiner, S. A., Birke, M., Winkler, T. H., and Slany, R. K. (2001). The ENL moiety of the childhood leukemia-associated MLL-ENL oncoprotein recruits human Polycomb 3. *Oncogene* 20, 411-419.

Garzon, R., Garofalo, M., Martelli, M. P., Briesewitz, R., Wang, L., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Liu, C. G., Schnittger, S., Haferlach, T., et al. (2008). Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3945-3950.

Gaussmann, A., Wenger, T., Eberle, I., Bursen, A., Bracharz, S., Herr, I., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2007). Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL.AF4 and AF4.MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene* 26, 3352-3363.

Gecz, J., Gedeon, A. K., Sutherland, G. R., and Mulley, J. C. (1996). Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 13, 105-108.

Gillert, E., Leis, T., Repp, R., Reichel, M., Hosch, A., Breitenlohner, I., Angermuller, S., Borkhardt, A., Harbott, J., Lampert, F., et al. (1999). A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells. *Oncogene* 18, 4663-4671.

Giugliano, E., Rege-Cambrin, G., Scaravaglio, P., Serra, A., Wlodarska, I., Emanuel, B., Saglio, G., and Hagemeijer, A. (2001). MLL-AF6 fusion resulting from a new three-way translocation t(6;11;7) in a patient with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 15, 1674-1676.

Grisendi, S., Mecucci, C., Falini, B., and Pandolfi, P. P. (2006). Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 493-505.

Grummitt, C. G., Townsley, F. M., Johnson, C. M., Warren, A. J., and Bycroft, M. (2008). Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 283, 23326-23332.

Gu, Y., Nakamura, T., Alder, H., Prasad, R., Canaani, O., Cimino, G., Croce, C. M., and Canaani, E. (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell* 71, 701-708.

Guenther, M. G., Lawton, L. N., Rozovskaia, T., Frampton, G. M., Levine, S. S., Volkert, T. L., Croce, C. M., Nakamura, T., Canaani, E., and Young, R. A. (2008). Aberrant chromatin at genes encoding stem cell regulators in human mixed-lineage leukemia. *Genes Dev* 22, 3403-3408.

Guru, S. C., Olufemi, S. E., Manickam, P., Cummings, C., Gieser, L. M., Pike, B. L., Bittner, M. L., Jiang, Y., Chinault, A. C., Nowak, N. J., et al. (1997). A 2.8-Mb clone contig of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) region at 11q13. *Genomics* 42, 436-445.

Gurumurthy, M., Tan, C. H., Ng, R., Zeiger, L., Lau, J., Lee, J., Dey, A., Philp, R., Li, Q., Lim, T. M., et al. (2008). Nucleophosmin interacts with HEXIM1 and regulates RNA polymerase II transcription. *J Mol Biol* 378, 302-317.

Hanson, R. D., Hess, J. L., Yu, B. D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, N. M., Shashikant, C. S., Ruddle, F. H., Seto, M., and Korsmeyer, S. J. (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14372-14377.

Hemenway, C. S., de Erkenez, A. C., and Gould, G. C. (2001). The polycomb protein MPc3 interacts with AF9, an MLL fusion partner in t(9;11)(p22;q23) acute leukemias. *Oncogene* 20, 3798-3805.

Hess, J. L. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* 10, 500-507.

Hess, J. L., Yu, B. D., Li, B., Hanson, R., and Korsmeyer, S. J. (1997). Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* 90, 1799-1806.

Hsieh, J. J., Ernst, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S. J. (2003). Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol* 23, 186-194.

Hoffbrand, A. V., Pettit J. E., Moss P. A. H., and Hoelzer D. (2003). "Grundkurs Hämatologie."

Hsu, C. Y., and Yung, B. Y. (1998). Down-regulation of nucleophosmin/B23 during retinoic acid-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Oncogene* 16, 915-923.

Huang, B., Yang, X., Zhou, M. M., Ozato, K., and Chen, L. F. (2008). Brd4 Coactivates Transcriptional Activation of NF- κ B Via Specific Binding to Acetylated RelA. *Mol Cell Biol*.

Hughes, C. M., Rozenblatt-Rosen, O., Milne, T. A., Copeland, T. D., Levine, S. S., Lee, J. C., Hayes, D. N., Shanmugam, K. S., Bhattacharjee, A., Biondi, C. A., et al. (2004). Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell* 13, 587-597.

Huret, J. L., Dessen, P., and Bernheim, A. (2001). An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia* 15, 987-989.

Isaacs, A. M., Oliver, P. L., Jones, E. L., Jeans, A., Potter, A., Hovik, B. H., Nolan, P. M., Vizer, L., Glenister, P., Simon, A. K., et al. (2003). A mutation in Af4 is predicted to cause cerebellar ataxia and cataracts in the robotic mouse. *J Neurosci* 23, 1631-1637.

Isnard, P., Core, N., Naquet, P., and Djabali, M. (2000). Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood* 96, 705-710.

Jang, M. K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H. S., Brady, J. N., and Ozato, K. (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* 19, 523-534.

Johansson, B., Mertens, F., and Mitelman, F. (1996). Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* 16, 155-163.

Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T., and Peterlin, B. M. (2003). c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene* 22, 5707-5711.

Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.

Klein, G. (2000). Dysregulation of lymphocyte proliferation by chromosomal translocations and sequential genetic changes. *Bioessays* 22, 414-422.

Kowarz, E., Burmeister, T., Lo Nigro, L., Jansen, M. W., Delabesse, E., Klingebiel, T., Dingermann, T., Meyer, C., and Marschalek, R. (2007). Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4.MLL fusion allele. *Leukemia* 21, 1232-1238.

Krivtsov, A. V., and Armstrong, S. A. (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 7, 823-833.

Krivtsov, A. V., Feng, Z., Lemieux, M. E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A. U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A. P., Silverman, L. B., et al. (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* 14, 355-368.

Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L., and Jenuwein, T. (1997). Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in Drosophila heterochromatin and at S. cerevisiae telomeres. *Embo J* 16, 3219-3232.

Lavau, C., Luo, R. T., Du, C., and Thirman, M. J. (2000). Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10984-10989.

Lavau, C., Szilvassy, S. J., Slany, R., and Cleary, M. L. (1997). immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *Embo J* 16, 4226-4237.

Li, J., Zhang, X., Sejas, D. P., and Pang, Q. (2005). Negative regulation of p53 by nucleophosmin antagonizes stress-induced apoptosis in human normal and malignant hematopoietic cells. *Leuk Res* 29, 1415-1423.

Li, X., and Stark, G. R. (2002). NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30, 285-296.

Li, Z., Boone, D., and Hann, S. R. (2008). Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18794-18799.

Lin, C. Y., Liang, Y. C., and Yung, B. Y. (2006). Nucleophosmin/B23 regulates transcriptional activation of E2F1 via modulating the promoter binding of NF-kappaB, E2F1 and pRB. *Cell Signal* 18, 2041-2048.

Liu, H., Cheng, E. H., and Hsieh, J. J. (2007). Bimodal degradation of MLL by SCFSkp2 and APCDdc20 assures cell cycle execution: a critical regulatory circuit lost in leukemogenic MLL fusions. *Genes Dev* 21, 2385-2398.

Liu, W. H., and Yung, B. Y. (1998). Mortalization of human promyelocytic leukemia HL-60 cells to be more susceptible to sodium butyrate-induced apoptosis and inhibition of telomerase activity by down-regulation of nucleophosmin/B23. *Oncogene* 17, 3055-3064.

Look, A. T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059-1064.

Ma, C., and Staudt, L. M. (1996). LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias. *Blood* 87, 734-745.

Ma, Q., Alder, H., Nelson, K. K., Chatterjee, D., Gu, Y., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M., Siracusa, L. D., and Buchberg, A. M. (1993). Analysis of the murine All-1 gene reveals conserved domains with human ALL-1 and identifies a motif shared with DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6350-6354.

Maillard, I., Chen, Y. X., Friedman, A., Yang, Y., Tubbs, A. T., Shestova, O., Pear, W. S., and Hua, X. (2008). Menin regulates the function of hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors. *Blood*.

Marschalek, R., Nilson, I., Lochner, K., Greim, R., Siegler, G., Greil, J., Beck, J. D., and Fey, G. H. (1997). The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* 27, 417-428.

Martin, M. E., Milne, T. A., Bloyer, S., Galoian, K., Shen, W., Gibbs, D., Brock, H. W., Slany, R., and Hess, J. L. (2003). Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* 4, 197-207.

Metzler, M., Forster, A., Pannell, R., Arends, M. J., Daser, A., Lobato, M. N., and Rabbitts, T. H. (2006). A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumourigenesis using invertebrate technology. *Oncogene* 25, 3093-3103.

Meyer, C., Kowarz, E., Hofmann, J., Renneville, A., Zuna, J., Trka, J., Ben Abdelali, R., Macintyre, E., De Braekeleer, E., De Braekeleer, M., et al. (2009). New insights to the MLL recombinoome of acute leukemias. *Leukemia*.

Meyer, C. und Marschalek, R., Poster DCAL (2009). The MLL Recombinoome of Acute Leukemia

Meyer, C., Schneider, B., Jakob, S., Strehl, S., Attarbaschi, A., Schnittger, S., Schoch, C., Jansen, M. W., van Dongen, J. J., den Boer, M. L., et al. (2006). The MLL recombinoome of acute leukemias. *Leukemia* 20, 777-784.

Meyer, C., Schneider, B., Reichel, M., Angermueller, S., Strehl, S., Schnittger, S., Schoch, C., Jansen, M. W., van Dongen, J. J., Pieters, R., et al. (2005). Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 449-454.

Michalik, J., Yeoman, L. C., and Busch, H. (1981). Nucleolar localization of protein B23 (37/5.1) by immunocytochemical techniques. *Life Sci* 28, 1371-1379.

Michels, A. A., Fraldi, A., Li, Q., Adamson, T. E., Bonnet, F., Nguyen, V. T., Sedore, S. C., Price, J. P., Price, D. H., Lania, L., and Bensaude, O. (2004). Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *Embo J* 23, 2608-2619.

Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D., and Hess, J. L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10, 1107-1117.

Milne, T. A., Hughes, C. M., Lloyd, R., Yang, Z., Rozenblatt-Rosen, O., Dou, Y., Schnepf, R. W., Krankel, C., Livolsi, V. A., Gibbs, D., et al. (2005). Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 749-754.

Morrissey, J., Tkachuk, D. C., Milatovich, A., Francke, U., Link, M., and Cleary, M. L. (1993). A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias. *Blood* 81, 1124-1131.

Mueller, D., Bach, C., Zeisig, D., Garcia-Cuellar, M. P., Monroe, S., Sreekumar, A., Zhou, R., Nesvzhskii, A., Chinnaiyan, A., Hess, J. L., and Slany, R. K. (2007). A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* 110, 4445-4454.

Muntean, A. G., Giannola, D., Udager, A. M., and Hess, J. L. (2008). The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation. *Blood* 112, 4690-4693.

Nagayama, J., Tomizawa, D., Koh, K., Nagatoshi, Y., Hotta, N., Kishimoto, T., Takahashi, Y., Kuno, T., Sugita, K., Sato, T., et al. (2006). Infants with acute lymphoblastic leukemia and a germline MLL gene are highly curable with use of chemotherapy alone: results from the Japan Infant Leukemia Study Group. *Blood* 107, 4663-4665.

Nagy, P. L., Griesenbeck, J., Kornberg, R. D., and Cleary, M. L. (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 90-94.

Nakamura, T., Canaani, E., and Croce, C. M. (2007). Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10980-10985.

Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C. M., and Canaani, E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 10, 1119-1128.

Nilson, I., Lochner, K., Siegler, G., Greil, J., Beck, J. D., Fey, G. H., and Marschalek, R. (1996). Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* 93, 966-972.

Nilson, I., Reichel, M., Ennas, M. G., Greim, R., Knorr, C., Siegler, G., Greil, J., Fey, G. H., and Marschalek, R. (1997). Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. *Br J Haematol* 98, 157-169.

Okuwaki, M. (2008). The structure and functions of NPM1/Nucleophsmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem* 143, 441-448.

Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., and Nagata, K. (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* 506, 272-276.

Oliver, P. L., Bitoun, E., Clark, J., Jones, E. L., and Davies, K. E. (2004). Mediation of Af4 protein function in the cerebellum by Siah proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14901-14906.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.

Paro, R., Strutt, H., and Cavalli, G. (1998). Heritable chromatin states induced by the Polycomb and trithorax group genes. *Novartis Found Symp* 214, 51-61; discussion 61-56, 104-113.

Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M. K., and Johansson, B. (1998). Balanced chromosome aberrations in leukemias following chemotherapy with DNA-topoisomerase II inhibitors. *J Clin Oncol* 16, 1897-1898.

Pedersen-Bjergaard, J., and Rowley, J. D. (1994). The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* 83, 2780-2786.

Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.

Phatnani, H. P., and Greenleaf, A. L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 20, 2922-2936.

Pirrotta, V. (1998). Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell* 93, 333-336.

Popovic, R., Riesbeck, L. E., Velu, C. S., Chaubey, A., Zhang, J., Achille, N. J., Erfurth, F. E., Eaton, K., Lu, J., Grimes, H. L., et al. (2009). Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood*.

Prasad, R., Yano, T., Sorio, C., Nakamura, T., Rallapalli, R., Gu, Y., Leshkowitz, D., Croce, C. M., and Canaani, E. (1995). Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12160-12164.

Pschyrembel (2004). "Pschyrembel Klinisches Wörterbuch."

Pui, C. H., Frankel, L. S., Carroll, A. J., Raimondi, S. C., Shuster, J. J., Head, D. R., Crist, W. M., Land, V. J., Pullen, D. J., Steuber, C. P., and et al. (1991). Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood* 77, 440-447.

Rabbitts, T. H. (1991). Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* 67, 641-644.

Rabbitts, T. H. (1999). Perspective: chromosomal translocations can affect genes controlling gene expression and differentiation--why are these functions targeted? *J Pathol* 187, 39-42.

Rayet, B., and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938-6947.

Reaman, G. H., Sposto, R., Sensel, M. G., Lange, B. J., Feusner, J. H., Heerema, N. A., Leonard, M., Holmes, E. J., Sather, H. N., Pendergrass, T. W., et al. (1999). Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 17, 445-455.

Reichel, M., Gillert, E., Angermuller, S., Hensel, J. P., Heidel, F., Lode, M., Leis, T., Biondi, A., Haas, O. A., Strehl, S., et al. (2001). Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene* 20, 2900-2907.

Reichel, M., Gillert, E., Breitenlohner, I., Repp, R., Greil, J., Beck, J. D., Fey, G. H., and Marschalek, R. (1999). Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Cancer Res* 59, 3357-3362.

Reichel, M., Gillert, E., Nilson, I., Siegler, G., Greil, J., Fey, G. H., and Marschalek, R. (1998). Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* 17, 3035-3044.

Rietschel, B., Arrey, T. N., Meyer, B., Bornemann, S., Schuerken, M., Karas, M., and Poetsch, A. (2008). Elastase digests: New ammunition for shotgun membrane proteomics. *Mol Cell Proteomics*.

Rowley, J. D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290-293.

Rowley, J. D. (1992). The der(11) chromosome contains the critical breakpoint junction in the 4;11, 9;11, and 11;19 translocations in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 5, 264-266.

Rubnitz, J. E., Behm, F. G., and Downing, J. R. (1996). 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* 10, 74-82.

Rubnitz, J. E., Morrissey, J., Savage, P. A., and Cleary, M. L. (1994). ENL, the gene fused with HRX in t(11;19) leukemias, encodes a nuclear protein with transcriptional activation potential in lymphoid and myeloid cells. *Blood* 84, 1747-1752.

Sanchez-Garcia, I., and Rabbitts, T. H. (1993). LIM domain proteins in leukaemia and development. *Semin Cancer Biol* 4, 349-358.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.

Shinobu, N., Maeda, T., Aso, T., Ito, T., Kondo, T., Koike, K., and Hatakeyama, M. (1999). Physical interaction and functional antagonism between the RNA polymerase II elongation factor ELL and p53. *J Biol Chem* 274, 17003-17010.

Simone, F., Polak, P. E., Kaberlein, J. J., Luo, R. T., Levitan, D. A., and Thirman, M. J. (2001). EAF1, a novel ELL-associated factor that is delocalized by expression of the MLL-ELL fusion protein. *Blood* 98, 201-209.

Slany, R. K., Lavau, C., and Cleary, M. L. (1998). The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol Cell Biol* 18, 122-129.

Song, J. J., and Kingston, R. E. (2008). WDR5 Interacts with Mixed Lineage Leukemia (MLL) Protein via the Histone H3-binding Pocket. *J Biol Chem* 283, 35258-35264.

Srinivasan, R. S., Nesbit, J. B., Marrero, L., Erfurth, F., LaRussa, V. F., and Hemenway, C. S. (2004). The synthetic peptide PFWT disrupts AF4-AF9 protein complexes and induces apoptosis in t(4;11) leukemia cells. *Leukemia* 18, 1364-1372.

Steger, D. J., Lefterova, M. I., Ying, L., Stonestrom, A. J., Schupp, M., Zhuo, D., Vakoc, A. L., Kim, J. E., Chen, J., Lazar, M. A., et al. (2008). DOT1L/KMT4 recruitment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 28, 2825-2839.

Strout, M. P., Marcucci, G., Bloomfield, C. D., and Caligiuri, M. A. (1998). The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2390-2395.

Szebeni, A., and Olson, M. O. (1999). Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* 8, 905-912.

Takeda, S., Chen, D. Y., Westergard, T. D., Fisher, J. K., Rubens, J. A., Sasagawa, S., Kan, J. T., Korsmeyer, S. J., Cheng, E. H., and Hsieh, J. J. (2006). Proteolysis of MLL family proteins is essential for caspase-1-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev* 20, 2397-2409.

Taki, T., Kano, H., Taniwaki, M., Sako, M., Yanagisawa, M., and Hayashi, Y. (1999). AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins(5;11)(q31;q13q23). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14535-14540.

Tan, C. C., Sindhu, K. V., Li, S., Nishio, H., Stoller, J. Z., Oishi, K., Puttreddy, S., Lee, T. J., Epstein, J. A., Walsh, M. J., and Gelb, B. D. (2008). Transcription factor Ap2delta associates with Ash2l and ALR, a trithorax family histone methyltransferase, to activate Hoxc8 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7472-7477.

Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D., and Zhang, D. E. (1997). Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 90, 489-519.

Terranova, R., Agherbi, H., Boned, A., Meresse, S., and Djabali, M. (2006). Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6629-6634.

Teyssier, J. R., Bartram, C. R., Deville, J., Potron, G., and Pigeon, F. (1985). c-abl Oncogene and chromosome 22 "bcr" juxtaposition in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 312, 1393-1394.

Thirman, M. J., Gill, H. J., Burnett, R. C., Mbangkollo, D., McCabe, N. R., Kobayashi, H., Ziemer-van der Poel, S., Kaneko, Y., Morgan, R., Sandberg, A. A., and et al. (1993). Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* 329, 909-914.

Thomas, M., Gessner, A., Vornlocher, H. P., Hadwiger, P., Greil, J., and Heidenreich, O. (2005). Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood* 106, 3559-3566.

Tkachuk, D. C., Kohler, S., and Cleary, M. L. (1992). Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 71, 691-700.

Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., and Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J* 13, 3822-3831.

Tyagi, S., Chabes, A. L., Wysocka, J., and Herr, W. (2007). E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell* 27, 107-119.

Van den Berghe, H., David, G., Broeckert-Van Orshoven, A., Louwagie, A., Verwilghen, R., Casteels-Van Daele, M., Eggermont, E., and Eeckels, R. (1979). A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Hum Genet* 46, 173-180.

van Lohuizen, M. (1999). The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Curr Opin Genet Dev* 9, 355-361.

van Lohuizen, M., Tijms, M., Voncken, J. W., Schumacher, A., Magnuson, T., and Wientjens, E. (1998). Interaction of mouse polycomb-group (Pc-G) proteins Enx1 and Enx2 with Eed: indication for separate Pc-G complexes. *Mol Cell Biol* 18, 3572-3579.

von Bergh, A. R., Beverloo, H. B., Rombout, P., van Wering, E. R., van Weel, M. H., Beverstock, G. C., Kluin, P. M., Slater, R. M., and Schuurin, E. (2002). LAF4, an AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 35, 92-96.

Wang, J., Iwasaki, H., Krivtsov, A., Febbo, P. G., Thorner, A. R., Ernst, P., Anastasiadou, E., Kutok, J. L., Kogan, S. C., Zinkel, S. S., et al. (2005). Conditional MLL-CBP targets GMP and models therapy-related myeloproliferative disease. *Embo J* 24, 368-381.

Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H., and Allis, C. D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121, 859-872.

Xia, Z. B., Anderson, M., Diaz, M. O., and Zeleznik-Le, N. J. (2003). MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8342-8347.

Xia, Z. B., Popovic, R., Chen, J., Theisler, C., Stuart, T., Santillan, D. A., Erfurth, F., Diaz, M. O., and Zeleznik-Le, N. J. (2005). The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14028-14033.

Xiao, J., Zhang, Z., Gong Chen, G., Zhang, M., Ding, Y., Fu, J., Li, M., and Yun, J. P. (2009). Nucleophosmin/B23 interacts with p21(WAF1/CIP1) and contributes to its stability. *Cell Cycle* 8.

Yagi, H., Deguchi, K., Aono, A., Tani, Y., Kishimoto, T., and Komori, T. (1998). Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* 92, 108-117.

Yang, Z., He, N., and Zhou, Q. (2008). Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 28, 967-976.

Yang, Z., Yik, J. H., Chen, R., He, N., Jang, M. K., Ozato, K., and Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* 19, 535-545.

Yano, T., Nakamura, T., Blechman, J., Sorio, C., Dang, C. V., Geiger, B., and Canaani, E. (1997). Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7286-7291.

Yik, J. H., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J. L., Link, A. J., and Zhou, Q. (2003). Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell* 12, 971-982.

Yokoyama, A., Kitabayashi, I., Ayton, P. M., Cleary, M. L., and Ohki, M. (2002). Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* 100, 3710-3718.

Yokoyama, A., Wang, Z., Wysocka, J., Sanyal, M., Aufiero, D. J., Kitabayashi, I., Herr, W., and Cleary, M. L. (2004). Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* 24, 5639-5649.

You, B. J., Huang, I. J., Liu, W. H., Hung, Y. B., Chang, J. H., and Yung, B. Y. (1999). Decrease in nucleophosmin/B23 mRNA and telomerase activity during indomethacin-induced apoptosis of gastric KATO-III cancer cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360, 683-690.

Yu, B. D., Hanson, R. D., Hess, J. L., Horning, S. E., and Korsmeyer, S. J. (1998). MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10632-10636.

Yu, B. D., Hess, J. L., Horning, S. E., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378, 505-508.

Zeisig, D. T., Bittner, C. B., Zeisig, B. B., Garcia-Cuellar, M. P., Hess, J. L., and Slany, R. K. (2005). The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* 24, 5525-5532.

Zelevnik-Le, N. J., Harden, A. M., and Rowley, J. D. (1994). 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10610-10614.

Zeng, L., and Zhou, M. M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513, 124-128.

Zhang, Y., and Rowley, J. D. (2006). Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair (Amst)* 5, 1282-1297.

Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1, 661-671.

Zhou, Q., and Yik, J. H. (2006). The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 646-659.

Ziemin-van der Poel, S., McCabe, N. R., Gill, H. J., Espinosa, R., III, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S. D., LeBeau, M. M., Rowley, J. D., and et al. (1991). Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10735-10739.

7 Anhang

7.1 Tabellen der nLC-MALDI-MS/MS-Messungen

Database : SwissProt 51.6 (257964 sequences; 93947433 residues)

Taxonomy : Homo sapiens (human) (15720 sequences)

Taxonomy filter	Homo sapiens (human)
Enzyme	Trypsin
Maximum Missed Cleavages	2
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)
Quantitation method	None
Variable modifications	Oxidation (M)
Peptide Mass Tolerance	30
Peptide Mass Tolerance Units	ppm
Fragment Mass Tolerance	0,3
Fragment Mass Tolerance Units	Da
Mass values	Monoisotopic
Instrument type	MALDI-TOF-TOF

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen der Negativkontrolle 293T:

prot_hit_num	prot_acc	peptides	prot_mass	prot_pl
1	PYC_HUMAN	26	130293	6,37
2	PCCA_HUMAN	24	77932	6,63
3	PCCB_HUMAN	16	58806	7,56
4	MCCC2_HUMAN	11	61808	7,57
5	HSP71_HUMAN	10	70280	5,48
6	K2C1_HUMAN	8	66149	8,16
7	GRP78_HUMAN	6	72402	5,07
8	ACTB_HUMAN	5	42052	5,29
9	ATX2L_HUMAN	4	113589	8,7
10	HSP7C_HUMAN	4	71082	5,37
11	GRP75_HUMAN	4	73920	5,87
12	MCCA_HUMAN	4	80935	7,66
13	K1C9_HUMAN	2	62320	5,19
14	EF1G_HUMAN	2	50429	6,25
15	GCSH_HUMAN	1	19127	4,91
16	PIMT_HUMAN	1	24806	6,7
17	KNG1_HUMAN	1	72996	6,34
18	UBP35_HUMAN	1	114987	5,43
19	CORT_HUMAN	1	11639	8,84
20	K2C6A_HUMAN	1	60293	8,09

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen des AF4-Proteinkomplexes:

prot_hit_num	prot_acc	peptides	prot_mass	prot_pl
1	AFF1_HUMAN	106	132139	9,26
2	HSP71_HUMAN	49	70280	5,48
3	HSP7C_HUMAN	36	71082	5,37
4	HSP76_HUMAN	32	71440	5,81
5	GRP78_HUMAN	31	72402	5,07
6	HS90B_HUMAN	26	83554	4,97
7	TBB5_HUMAN	25	50095	4,78
8	TBB2C_HUMAN	23	50255	4,79
9	HS90A_HUMAN	22	85006	4,94
10	ENL_HUMAN	22	62417	8,75
11	TBAK_HUMAN	21	50804	4,94
12	HS70L_HUMAN	20	70730	5,76
13	TBB2A_HUMAN	20	50274	4,78
14	TBA3_HUMAN	20	50788	4,94
15	TBA6_HUMAN	19	50548	4,96
16	EF2_HUMAN	19	96246	6,41
17	TBB4_HUMAN	18	50010	4,78
18	TBA2_HUMAN	15	50612	4,97
19	GRP75_HUMAN	14	73920	5,87
20	ATX2L_HUMAN	14	113589	8,7
21	HS105_HUMAN	14	97716	5,28
22	FAS_HUMAN	14	275850	5,99
23	ACTB_HUMAN	13	42052	5,29
24	CDK9_HUMAN	12	43149	8,97
25	K2C1_HUMAN	11	66149	8,16
26	PYC_HUMAN	11	130293	6,37
27	CCNT1_HUMAN	11	81034	8,9
28	ENOA_HUMAN	10	47481	7,01
29	ATPB_HUMAN	10	56525	5,26
30	EF1G_HUMAN	10	50429	6,25
31	VIME_HUMAN	10	53676	5,06
32	PGRC1_HUMAN	9	21772	4,56
33	DDX6_HUMAN	9	54781	8,85
34	IMA4_HUMAN	9	58364	4,8
35	COA1_HUMAN	9	267095	5,95
36	ACTC_HUMAN	8	42334	5,23
37	CH60_HUMAN	8	61187	5,7
38	G3P_HUMAN	8	36201	8,57
39	CALX_HUMAN	8	67982	4,47
40	TPIS_HUMAN	8	26938	6,45
41	EF1A1_HUMAN	8	50451	9,1
42	ACLY_HUMAN	8	121674	6,95
43	TCPB_HUMAN	7	57794	6,01
44	IMA2_HUMAN	7	58168	5,25
45	4F2_HUMAN	7	58023	5,2

46	TCPA_HUMAN	7	60819	5,8
47	AFF4_HUMAN	7	127781	9,33
48	IMA3_HUMAN	7	58288	4,8
49	K1C9_HUMAN	6	62320	5,19
50	NPM_HUMAN	6	32726	4,64
51	TCPH_HUMAN	6	59842	7,55
52	TCPG_HUMAN	6	61066	6,1
53	K1C10_HUMAN	6	59711	5,13
54	ROA1_HUMAN	5	38936	9,26
55	RBM25_HUMAN	5	94407	5,97
56	PPIA_HUMAN	5	18229	7,68
57	TCPE_HUMAN	5	60089	5,45
58	KPYM_HUMAN	5	58470	7,96
59	NDKB_HUMAN	5	17401	8,52
60	HSP74_HUMAN	5	95096	5,18
61	RL15_HUMAN	5	24245	11,62
62	PRP40_HUMAN	5	109022	7,18
63	PRDX1_HUMAN	5	22324	8,27
64	PGAM1_HUMAN	5	28900	6,67
65	COF1_HUMAN	5	18719	8,22
66	CLH1_HUMAN	5	193260	5,48
67	PIMT_HUMAN	5	24806	6,7
68	SYEP_HUMAN	5	164520	7,77
69	EF1D_HUMAN	5	31217	4,9
70	K22E_HUMAN	5	66110	8,07
71	IF39_HUMAN	5	92833	4,89
72	ATPA_HUMAN	4	59828	9,16
73	SF3A1_HUMAN	4	88888	5,15
74	HNRH1_HUMAN	4	49484	5,89
75	GDIB_HUMAN	4	51087	6,11
76	YBOX1_HUMAN	4	35903	9,87
77	TERA_HUMAN	4	89950	5,14
78	ROA2_HUMAN	4	37464	8,97
79	ALDOA_HUMAN	4	39851	8,3
80	ADT2_HUMAN	4	33102	9,76
81	HNRPK_HUMAN	4	51230	5,39
82	IF3A_HUMAN	4	166867	6,38
83	MDHM_HUMAN	4	35965	8,92
84	K2C5_HUMAN	4	62637	8,14
85	HORN_HUMAN	4	283140	10,05
86	AT1A1_HUMAN	4	114135	5,33
87	RS4X_HUMAN	4	29807	10,16
88	IMA1_HUMAN	4	60952	4,94
89	IMA7_HUMAN	4	60733	4,89
90	IMB1_HUMAN	3	98420	4,68
91	TCPD_HUMAN	3	58401	7,96
92	CAH2_HUMAN	3	29285	6,87
93	GDIA_HUMAN	3	51177	5
94	CH10_HUMAN	3	10925	8,89

95	HNRPF_HUMAN	3	45985	5,38
96	PRDX2_HUMAN	3	22049	5,66
97	NDKA_HUMAN	3	17309	5,83
98	UBE1_HUMAN	3	118858	5,49
99	EFTU_HUMAN	3	49852	7,26
100	CALR_HUMAN	3	48283	4,29
101	MOES_HUMAN	3	67892	6,08
102	U5S1_HUMAN	3	110336	4,84
103	K2C6A_HUMAN	3	60293	8,09
104	PGK1_HUMAN	3	44985	8,3
105	PDIA3_HUMAN	3	57146	5,98
106	RS19_HUMAN	3	16051	10,31
107	PUR6_HUMAN	3	47790	6,95
108	SF3A2_HUMAN	3	49338	9,65
109	MYH9_HUMAN	3	227646	5,5
110	RBBP7_HUMAN	3	48132	4,89
111	KAD2_HUMAN	3	26689	7,67
112	SMC4_HUMAN	3	147775	6,37
113	HS74L_HUMAN	3	95453	5,63
114	HNRPU_HUMAN	3	91164	5,76
115	SYIC_HUMAN	3	146178	5,86
116	PRDX6_HUMAN	2	25133	6
117	TCPZ_HUMAN	2	58444	6,23
118	CNBP_HUMAN	2	20704	8
119	GSTP1_HUMAN	2	23569	5,43
120	DNJA1_HUMAN	2	45581	6,65
121	KCRB_HUMAN	2	42902	5,34
122	IF5A1_HUMAN	2	17049	5,08
123	RAB10_HUMAN	2	22755	8,59
124	PP2CG_HUMAN	2	59919	4,28
125	RL6_HUMAN	2	32765	10,59
126	RAP1A_HUMAN	2	21316	6,38
127	SF3A3_HUMAN	2	59154	5,27
128	CALM_HUMAN	2	16827	4,09
129	KU70_HUMAN	2	70084	6,23
130	RIB1_HUMAN	2	68641	5,96
131	TOM70_HUMAN	2	68096	6,75
132	SFPQ_HUMAN	2	76216	9,45
133	RAN_HUMAN	2	24579	7,01
134	KINH_HUMAN	2	110358	6,12
135	RS18_HUMAN	2	17708	10,99
136	TRAP1_HUMAN	2	80345	8,3
137	HMGB1_HUMAN	2	25049	5,62
138	LDHB_HUMAN	2	36900	5,71
139	MPCP_HUMAN	2	40525	9,45
140	C1QBP_HUMAN	2	31742	4,74
141	IF3I_HUMAN	2	66912	5,93
142	NP1L1_HUMAN	2	45631	4,36
143	MIF_HUMAN	2	12639	7,74

144	IF4A1_HUMAN	2	46353	5,32
145	PHB2_HUMAN	2	33276	9,83
146	SERPH_HUMAN	2	46525	8,75
147	MLRM_HUMAN	2	19839	4,67
148	SYRC_HUMAN	2	76129	6,26
149	PDIA1_HUMAN	2	57480	4,76
150	HMOX1_HUMAN	2	32798	7,88
151	RAB7_HUMAN	2	23760	6,4
152	K2C4_HUMAN	2	57649	6,25
153	TKT_HUMAN	2	68519	7,58
154	RBBP4_HUMAN	2	47911	4,74
155	LDHA_HUMAN	2	36950	8,44
156	ENPL_HUMAN	2	92696	4,76
157	APT_HUMAN	2	19766	5,78
158	ACTN1_HUMAN	2	103563	5,25
159	SODC_HUMAN	2	16154	5,7
160	AT1A3_HUMAN	2	113102	5,22
161	PYR1_HUMAN	2	245167	6,02
162	PCCB_HUMAN	2	58806	7,56
163	PAIRB_HUMAN	2	44995	8,66
164	ACTZ_HUMAN	2	42701	6,19
165	DYHC_HUMAN	2	534809	6,01
166	MYL6_HUMAN	2	17090	4,56
167	UBIQ_HUMAN	2	8560	6,56
168	PRPS1_HUMAN	2	35325	6,51
169	RSSA_HUMAN	2	32947	4,79
170	ROAA_HUMAN	2	36704	9,04
171	RS10_HUMAN	2	18886	10,15
172	PCBP1_HUMAN	2	37987	6,66
173	MYH10_HUMAN	2	229824	5,44
174	EF1B_HUMAN	2	24919	4,5
175	OST48_HUMAN	2	48893	5,43
176	APEX1_HUMAN	2	35931	8,33
177	RCN2_HUMAN	2	36911	4,26
178	NUP50_HUMAN	2	50512	6,64
179	FLNA_HUMAN	2	283301	5,7
180	GCSH_HUMAN	2	19127	4,91
181	IF34_HUMAN	2	35874	5,87
182	SRP68_HUMAN	2	71199	8,75
183	TXND5_HUMAN	2	48283	5,63
184	RS20_HUMAN	2	13478	9,95
185	CSK2B_HUMAN	2	25268	5,33
186	KV206_HUMAN	1	14811	9,34
187	ROA3_HUMAN	1	39799	9,1
188	TCPQ_HUMAN	1	60153	5,42
189	SERA_HUMAN	1	57356	6,29
190	VINC_HUMAN	1	124292	5,5
191	NEDD8_HUMAN	1	9066	7,98
192	ANXA5_HUMAN	1	35971	4,94

193	PSMD1_HUMAN	1	106795	5,25
194	RLA1_HUMAN	1	11621	4,26
195	SSB_HUMAN	1	17249	9,59
196	IPO4_HUMAN	1	120181	4,88
197	DDB1_HUMAN	1	128142	5,14
198	PSMD2_HUMAN	1	100877	5,08
199	AAAT_HUMAN	1	57018	5,34
200	G6PI_HUMAN	1	63335	8,43
201	ARP3_HUMAN	1	47797	5,61
202	IPYR_HUMAN	1	33095	5,54
203	NOLC1_HUMAN	1	73677	9,48
204	HMGB2_HUMAN	1	24190	7,62
205	PYRG1_HUMAN	1	67332	6,02
206	PSME2_HUMAN	1	27515	5,44
207	PGRC2_HUMAN	1	23861	4,76
208	NP1L4_HUMAN	1	42968	4,6
209	RS24_HUMAN	1	15413	10,79
210	FUS_HUMAN	1	53622	9,4
211	LA_HUMAN	1	46979	6,68
212	TBCA_HUMAN	1	12904	5,25
213	IF35_HUMAN	1	37654	5,24
214	TEBP_HUMAN	1	18971	4,35
215	API5_HUMAN	1	57867	5,84
216	AN32A_HUMAN	1	28682	3,99
217	HMGB3_HUMAN	1	23137	8,48
218	AKA12_HUMAN	1	191895	4,38
219	IF36_HUMAN	1	52587	5,71
220	IPO7_HUMAN	1	120751	4,7
221	RS29_HUMAN	1	6900	10,17
222	BASI_HUMAN	1	42573	5,39
223	SEPT2_HUMAN	1	41689	6,15
224	DAZP1_HUMAN	1	43584	8,73
225	SSRD_HUMAN	1	19158	5,76
226	SYAC_HUMAN	1	107484	5,34
227	GCN1L_HUMAN	1	294953	7,19
228	THIO_HUMAN	1	12015	4,82
229	DHSA_HUMAN	1	73672	7,06
230	RAB6B_HUMAN	1	23561	5,41
231	DDX21_HUMAN	1	87804	9,32
232	GPSN2_HUMAN	1	36410	9,5
233	EWS_HUMAN	1	68721	9,37
234	RS5_HUMAN	1	23033	9,73
235	SURF4_HUMAN	1	30602	7,64
236	ECHM_HUMAN	1	31823	8,34
237	RS28_HUMAN	1	7893	10,7
238	PRS6B_HUMAN	1	47451	5,09
239	SAP_HUMAN	1	59899	5,06
240	P5CS_HUMAN	1	87989	6,66
241	K2C7_HUMAN	1	51443	5,5

242	K0310_HUMAN	1	234855	5,4
243	ERP29_HUMAN	1	29032	6,77
244	TXLNA_HUMAN	1	62195	6,15
245	DDX3X_HUMAN	1	73597	6,73
246	PYGL_HUMAN	1	97486	6,71
247	RANG_HUMAN	1	23467	5,19
248	RENT2_HUMAN	1	148972	5,5
249	RLA2_HUMAN	1	11658	4,42
250	PSD7_HUMAN	1	37060	6,29
251	IF4G1_HUMAN	1	176168	5,27
252	PSME3_HUMAN	1	29602	5,69
253	ATPO_HUMAN	1	23377	9,97
254	TADBP_HUMAN	1	45053	5,85
255	ASNS_HUMAN	1	64899	6,39
256	ATP5J_HUMAN	1	12580	9,52
257	RIB2_HUMAN	1	69355	5,44
258	1433Z_HUMAN	1	27899	4,73
259	SET_HUMAN	1	33469	4,23
260	IMB3_HUMAN	1	125032	4,83
261	1433E_HUMAN	1	29326	4,63
262	NDUS8_HUMAN	1	24203	6
263	CND3_HUMAN	1	115345	5,44
264	DHCA_HUMAN	1	30641	8,55
265	DYL1_HUMAN	1	10530	6,89
266	RL24_HUMAN	1	17882	11,26
267	STMN1_HUMAN	1	17292	5,76
268	RUVB1_HUMAN	1	50538	6,02
269	ATPK_HUMAN	1	11025	9,7
270	HRX_HUMAN	1	436044	9,22
271	PDIA6_HUMAN	1	48490	4,95
272	SYV_HUMAN	1	141642	7,53
273	RCC2_HUMAN	1	56790	9,02
274	RM10_HUMAN	1	29506	9,63
275	SPEE_HUMAN	1	34373	5,3
276	MTA2_HUMAN	1	75717	9,7
277	PRS4_HUMAN	1	49325	5,87
278	SYTC_HUMAN	1	84294	6,23
279	RL38_HUMAN	1	8270	10,1
280	PSB2_HUMAN	1	22993	6,51
281	KNG1_HUMAN	1	72996	6,34
282	TFR1_HUMAN	1	85274	6,18
283	RL10A_HUMAN	1	24987	9,94
284	H2A1A_HUMAN	1	14225	10,86
285	DPY30_HUMAN	1	11243	4,84
286	PRDX3_HUMAN	1	28017	7,67
287	RL12_HUMAN	1	17979	9,48
288	KLDC2_HUMAN	1	46697	6,13
289	DDX46_HUMAN	1	117803	9,33
290	SFRS3_HUMAN	1	19546	11,64

291	CPNE1_HUMAN	1	59649	5,52
292	RS27L_HUMAN	1	9813	9,57
293	UBP7_HUMAN	1	129274	5,33
294	C1TC_HUMAN	1	102180	6,89
295	PSMD3_HUMAN	1	61054	8,47
296	RCC1_HUMAN	1	45397	7,18
297	HDGF_HUMAN	1	26886	4,7
298	RD23B_HUMAN	1	43202	4,79
299	SYQ_HUMAN	1	88655	6,71
300	RS15A_HUMAN	1	14944	10,14
301	HXK1_HUMAN	1	103561	6,36
302	FXR1_HUMAN	1	69991	5,91
303	HINT1_HUMAN	1	13907	6,43
304	JIP4_HUMAN	1	146913	5,05
305	RS23_HUMAN	1	15969	10,5
306	G3BP2_HUMAN	1	54145	5,41
307	SRP09_HUMAN	1	10219	7,77
308	TIF1B_HUMAN	1	90261	5,52
309	PERQ2_HUMAN	1	150320	5,45
310	PSMD6_HUMAN	1	45787	5,45
311	PSA_HUMAN	1	103895	5,49
312	HCDH_HUMAN	1	34313	8,88
313	U520_HUMAN	1	246006	5,73
314	RL7A_HUMAN	1	30148	10,61
315	GBF1_HUMAN	1	208367	5,48
316	AMPL_HUMAN	1	56530	8,03
317	KAP2_HUMAN	1	45832	4,96
318	RL23_HUMAN	1	14970	10,51
319	IGHG2_HUMAN	1	36489	7,66
320	HSPB1_HUMAN	1	22826	5,98
321	RL18_HUMAN	1	21735	11,73
322	RGS3_HUMAN	1	134134	5,9
323	LAMP1_HUMAN	1	45201	9,22
324	PHB_HUMAN	1	29843	5,57
325	COTL1_HUMAN	1	16049	5,54
326	RL30_HUMAN	1	12947	9,65
327	TRY1_HUMAN	1	27111	6,08
328	RS7_HUMAN	1	22113	10,09
329	RL17_HUMAN	1	21611	10,18
330	SC23A_HUMAN	1	87004	6,64
331	LRC59_HUMAN	1	35308	9,61
332	SAHH_HUMAN	1	48255	5,92
333	RS9_HUMAN	1	22635	10,66
334	SGTA_HUMAN	1	34270	4,81
335	LAP2A_HUMAN	1	76016	7,56
336	GANAB_HUMAN	1	107263	5,74
337	OXRP_HUMAN	1	111494	5,16
338	RL8_HUMAN	1	28235	11,03
339	ENAM_HUMAN	1	129064	6,48

340	MBB1A_HUMAN	1	149731	9,34
341	YES_HUMAN	1	61276	6,32
342	CD2L7_HUMAN	1	164738	9,48
343	RS14_HUMAN	1	16434	10,07
344	SF3B3_HUMAN	1	136575	5,13
345	STT3A_HUMAN	1	80989	8,43
346	GP162_HUMAN	1	64631	8,83
347	AT2A2_HUMAN	1	116336	5,23
348	PCCA_HUMAN	1	77932	6,63
349	LPPRC_HUMAN	1	146306	5,5
350	ANM1_HUMAN	1	42029	5,31
351	CF060_HUMAN	1	119482	5,52
352	LAT1_HUMAN	1	55659	7,9
353	LAP2B_HUMAN	1	50696	9,39
354	SND1_HUMAN	1	102618	6,74
355	K0146_HUMAN	1	102135	6,22
356	BTNL3_HUMAN	1	52816	5,84
357	LAMP2_HUMAN	1	45503	5,35
358	PROF1_HUMAN	1	15216	8,44
359	CORT_HUMAN	1	11639	8,84
360	PUR2_HUMAN	1	108953	6,26
361	PTBP1_HUMAN	1	57357	9,22
362	XPO5_HUMAN	1	138332	5,56
363	PR285_HUMAN	1	298170	7,36
364	PFD2_HUMAN	1	16695	6,2
365	PIGR_HUMAN	1	84459	5,58
366	MMP15_HUMAN	1	76101	7,03
367	PUR9_HUMAN	1	65089	6,27
368	ROA0_HUMAN	1	30993	9,34
369	IF4H_HUMAN	1	27425	6,67
370	ENSA_HUMAN	1	13381	6,62
371	H1X_HUMAN	1	22474	10,76
372	UAP56_HUMAN	1	49416	5,44
373	MCA3_HUMAN	1	19855	8,54
374	PARP1_HUMAN	1	113811	8,99
375	RL36_HUMAN	1	12303	11,59
376	ANM5_HUMAN	1	73322	5,88
377	FLNB_HUMAN	1	280188	5,49
378	FAK1_HUMAN	1	119956	6,19
379	CENPU_HUMAN	1	47721	9,18
380	ZN516_HUMAN	1	126321	9,02
381	GP175_HUMAN	1	41426	5,72
382	PRKDC_HUMAN	1	473749	6,75
383	IF38_HUMAN	1	105962	5,48
384	AF9_HUMAN	1	63671	8,77
385	GRN_HUMAN	1	68518	6,43
386	LRMP_HUMAN	1	62681	5,68
387	SEPT7_HUMAN	1	50933	8,76
388	TM165_HUMAN	1	35055	6,54

389	SUHW3_HUMAN	1	84867	9,29
390	IF37_HUMAN	1	64560	5,79
391	SYDC_HUMAN	1	57499	6,11
392	RM27_HUMAN	1	16120	10,42
393	NHERF_HUMAN	1	39130	5,55
394	BOLA2_HUMAN	1	10281	6,07
395	CCNT2_HUMAN	1	81492	9,04
396	RL3L_HUMAN	1	46609	10,45
397	IGF1B_HUMAN	1	22454	9,78
398	TCOF_HUMAN	1	152241	9,06
399	NPA1P_HUMAN	1	254439	5,97
400	RAB2A_HUMAN	1	23702	6,08
401	UN45B_HUMAN	1	104979	8,03
402	LN28A_HUMAN	1	23241	8,35
403	2AAA_HUMAN	1	65980	4,96
404	GROA_HUMAN	1	11522	10,46
405	RUXE_HUMAN	1	10854	9,46
406	CG029_HUMAN	1	26621	7,05
407	MSH2_HUMAN	1	105418	5,58
408	INOC1_HUMAN	1	177556	9,53
409	CKAP4_HUMAN	1	66097	5,63
410	SFRS2_HUMAN	1	25461	11,86
411	CENA1_HUMAN	1	43740	9,1

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen des AF4•MLL-Proteinkomplexes:

prot_hit_num	prot_acc	peptides	prot_mass	prot_pi
1	HRX_HUMAN	131	436044	9,22
2	AFF1_HUMAN	44	132139	9,26
3	HSP71_HUMAN	38	70280	5,48
4	HSP7C_HUMAN	23	71082	5,37
5	GRP78_HUMAN	22	72402	5,07
6	HCFC1_HUMAN	14	210707	7,49
7	HSP76_HUMAN	13	71440	5,81
8	TBB5_HUMAN	11	50095	4,78
9	GRP75_HUMAN	10	73920	5,87
10	TBB2C_HUMAN	9	50255	4,79
11	ATX2L_HUMAN	9	113589	8,7
12	TBA6_HUMAN	7	50548	4,96
13	PIMT_HUMAN	7	24806	6,7
14	ACTB_HUMAN	6	42052	5,29
15	HS105_HUMAN	6	97716	5,28
16	EF1G_HUMAN	5	50429	6,25
17	RBBP5_HUMAN	4	59729	4,92
18	CH60_HUMAN	4	61187	5,7
19	WDR5_HUMAN	4	37136	8,54
20	DDX6_HUMAN	4	54781	8,85
21	ASH2L_HUMAN	4	69307	5,45

22	CSK21_HUMAN	3	45229	7,29
23	HS90A_HUMAN	3	85006	4,94
24	EF1A1_HUMAN	3	50451	9,1
25	CCNT1_HUMAN	3	81034	8,9
26	PSME3_HUMAN	3	29602	5,69
27	CSK2B_HUMAN	2	25268	5,33
28	MIF_HUMAN	2	12639	7,74
29	HSP74_HUMAN	2	95096	5,18
30	ADT2_HUMAN	2	33102	9,76
31	HS90B_HUMAN	2	83554	4,97
32	CDK9_HUMAN	2	43149	8,97
33	DPY30_HUMAN	2	11243	4,84
34	PRDX1_HUMAN	2	22324	8,27
35	PPIA_HUMAN	2	18229	7,68
36	PRDX4_HUMAN	2	30749	5,86
37	MCCC2_HUMAN	2	61808	7,57
38	GDE_HUMAN	2	176819	6,31
39	TCPB_HUMAN	2	57794	6,01
40	HCFC2_HUMAN	2	87694	8,75
41	K2C1_HUMAN	2	66149	8,16
42	EF2_HUMAN	1	96246	6,41
43	COA1_HUMAN	1	267095	5,95
44	RS29_HUMAN	1	6900	10,17
45	SET_HUMAN	1	33469	4,23
46	UTS2_HUMAN	1	14515	7,66
47	GCSH_HUMAN	1	19127	4,91
48	ACTN1_HUMAN	1	103563	5,25
49	TCPE_HUMAN	1	60089	5,45
50	RS9_HUMAN	1	22635	10,66
51	FAS_HUMAN	1	275850	5,99
52	HNRPF_HUMAN	1	45985	5,38
53	SERA_HUMAN	1	57356	6,29
54	ROA1_HUMAN	1	38936	9,26
55	SFPQ_HUMAN	1	76216	9,45
56	PP2AA_HUMAN	1	36142	5,3
57	SF3A1_HUMAN	1	88888	5,15
58	TCPG_HUMAN	1	61066	6,1
59	CLH1_HUMAN	1	193260	5,48
60	SYT4_HUMAN	1	48327	8,72
61	PGAM1_HUMAN	1	28900	6,67
62	CH10_HUMAN	1	10925	8,89
63	ASPP1_HUMAN	1	120082	6,25
64	NPM_HUMAN	1	32726	4,64
65	PGR1_HUMAN	1	21772	4,56
66	G3P_HUMAN	1	36201	8,57
67	ANK2_HUMAN	1	432588	5,03
68	HS74L_HUMAN	1	95453	5,63
69	SUCA_HUMAN	1	35424	9,11
70	COG1_HUMAN	1	110107	6,96

71	IMB1_HUMAN	1	98420	4,68
72	KCRB_HUMAN	1	42902	5,34
73	L1CAM_HUMAN	1	140885	5,84
74	WASF2_HUMAN	1	54478	5,38
75	K22E_HUMAN	1	66110	8,07
76	HTRA3_HUMAN	1	49489	6,71
77	STMN1_HUMAN	1	17292	5,76
78	RAN_HUMAN	1	24579	7,01
79	XYLT1_HUMAN	1	108357	9,32
80	CSK22_HUMAN	1	41358	8,65
81	MAGI1_HUMAN	1	165510	7,3
82	SNAT_HUMAN	1	23842	7,21

7.2 Abkürzungsverzeichnis

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Massenprozent
°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AC	accession number (Akzessionsnummer)
ad	add up to
AF4	ALL-1 fused gene on chromosome 4
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATCC	American Type Culture Collection
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
CAPS	3-(Cyclohexylamino)--propansulfonsäure
CD	cluster of differentiation
der11	Derivatchromosom 11 (MLL/AF4)
der4	Derivatchromosom 4 (AF4/MLL)
DNA	Desoxyribonucleicacid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dethiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde

HCl	Salzsäure
IgH	immunoglobulin heavy chain
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
LC	liquid chromatography
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
MLL	mixed lineage leukemia
mM	Millimolar
mol	Mol
MPC	Multi-Protein-Komplex
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
ng	Nanogramm
NHEJ	nonhomologous end joining
nLC	nanoLC (liquid chromatography)
PI	Isoelektrischer Punkt
ppm	parts per million
RNA	Ribonucleicacid
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEC	size exclusion chromatography
shRNA	short hairpin RNA
TBE	tris-borate EDTA
TOF	time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

7.3 Lebenslauf

Name: Anne Benedikt

Geburtsdatum: 25. Juni 1981

Geburtsort: Marburg/Lahn

Schul Ausbildung:

1986-1991 Grundschule am Weißen Stein Eddersheim

1991-2000 Main-Taunus-Schule Hofheim am Taunus,
Abschluss: Abitur

Akademische Ausbildung:

10/2000-08/2005 Studium der Biologie an der Goethe-Universität
Frankfurt am Main mit Schwerpunkt Biochemie,
Genetik und Biochemie der Pflanzen
Studienabschluss: Diplom-Biologin in Fachrichtung
Molekulare Biologie

12/2004-08/2005 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl-
Dieter Entian, betreut durch HD Dr. Torsten Stein, im
Institut für Mikrobiologie an der Goethe-Universität

Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung der bei
der Lantibiotikaimmunität beteiligten Lipoproteine
LanI

Seit 10/2005 Promotion am Fachbereich Biochemie, Chemie und
Pharmazie der Goethe-Universität Frankfurt am
Main, am Institut für Pharmazeutische Biologie, unter
Leitung von Prof. Dr. Rolf Marschalek.

Thema der Promotion: Der AF4- und AF4•MLL-
Multiproteinkomplex und deren potentielle Rollen in
transkriptionellen und epigenetischen Prozessen

Akademische Lehrer:

Prof. Dr. Feierabend, Prof. Dr. Starzinski-Powitz, Prof. Dr. Karl-Dieter Entian,
HD. Dr. Stein, Prof. Dr. Marschalek und Prof. Dr. Dinger mann

7.4 Publikationen und Vorträge

Unravelling the compositions of the AF4 and AF4•MLL multiprotein complex involved in transcriptional and epigenetic processes.

Benedikt, A. and Baltruschat, S., Arrey, T. N., Meyer, B., Karas, M, Bursen, A., Dingermann, T. and Marschalek, R.

Manuskript eingereicht bei Molecular Cell 2009

The human AF4 and AF4•MLL multiprotein complexes provide functions in transcription and epigenetic processes.

Vortrag auf der Jahrestagung der Kind-Phillip Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, Juni 2009

7.5 Danksagung

Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Überlassung des sehr interessanten Themas, die gute Betreuung, die rasche Durchsicht der Arbeit sowie die hilfreichen Diskussionen bei neuen Ideen, Ergebnissen oder Fragen.

Prof. Dr. Theo Dingermann für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung, die gute Zusammenarbeit während des Bioll-Praktikums und die interessanten Diskussionen bei den Arbeitsseminaren.

Julia Herglotz und der Arbeitsgruppe von Dr. Lausen am Georg-Speyer-Haus für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Etablierung des HMT-Assays. Des Weiteren ein Dank an Markus Heinrich aus der Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Grez für die Hilfe bei der Durchführung der Größenausschlusschromatographie.

Dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Michael Karas für die Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit sowie vor allem Tabiwang Arrey für die Durchführung der zahlreichen nLC-MALDI-Messungen.

Ein besonderer Dank gilt Sabrina Baltruschat für die tolle Zusammenarbeit, die interessanten und auch freundschaftlichen Gespräche im Labor und außerhalb.

Meinen ehemaligen und jetzigen Laborkollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit, die interessanten Gespräche sowie die schöne Zeit in Kaffeepausen und auch außerhalb des Labors: Dr. Ilse Zündorf, Dr. Sebastian Scharf, Ute Steiner, Miriam Braun, Dr. Jens Rabenstein, Dr. Sven Moritz, Dr. Clarissa Oehm, Dr. Anne Wenger, Dr. Claus Meyer, Dr. Eric Kowarz, Irina Eberle, Karen Schwabe, Nadine Silger, Jenny Hsieh, Birgit Pleß, Samaneh Sabiani sowie Dr. Oliver Siol, Dr. Thanh Chung und Dr. Ingo Jennes. Ein herzlicher Dank auch an Frau Erika Lemmer.

Dr. Adelheid Bursen danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die fortwährende Unterstützung während meiner Arbeit.

Bei den TA's Silvia Bracharz, Jennifer Merkens, Freia Pfeil und Julia Hofmann bedanke ich mich dafür, dass man immer auf ihre Hilfe zählen konnte. Ein weiterer Dank an Jenny für die ausgiebigen Defekturraum-Gespräche und die gute Zusammenarbeit während des Bioll-Praktikums.

Insbesondere danke ich meiner Familie, meinen Freunden und Hagen für die fortwährende Unterstützung, die Hilfe und den Zuspruch!

Hiermit erkläre ich, Anne Benedikt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Frankfurt am Main, den

Anne Benedikt